

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Caractérisation de la virulence d'un mutant de *Brucella melitensis* 16M ne produisant pas de flagelline

Legrand, Thomas

Award date:
2010

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR

Faculté des Sciences

Caractérisation de la virulence d'un mutant de *Brucella melitensis* 16M ne produisant pas de flagelline

Mémoire présenté pour l'obtention

du grade académique de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Thomas Legrand

Aout 2010

Caractérisation de la virulence d'un mutant de *Brucella melitensis* 16M ne produisant pas de flagelline

Thomas Legrand

Résumé:

Les TLRs (*Toll-Like Receptors*) et les NLRs (*Nod-Like Receptors*) constituent les deux classes majeures de récepteurs impliqués dans la détection de pathogènes par le système immunitaire inné identifiés à ce jour. Ceux-ci reconnaissent des motifs moléculaires hautement conservés et spécifiques de microorganismes (PAMPs, *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) et déclenchent des voies de signalisation précédant la mise en place de mécanismes effecteurs efficaces contre ceux-ci.

La flagelline est le monomère du filament du flagelle bactérien et est un des rares PAMPs de nature protéique recensés à l'heure actuelle. Elle peut être détectée dans les milieux extra- et intracellulaire respectivement par le TLR5 et par les NLRs Ipaf et Naip5. Alors que l'activation du TLR5 aboutit à l'expression de gènes pro-inflammatoires codant pour des cytokines ou des chémokines, la reconnaissance de la flagelline par Ipaf et Naip5 donne lieu à la formation de l'inflammasome, un complexe multiprotéique cytoplasmique responsable notamment du déclenchement d'une forme de mort cellulaire nommée pyroptose.

Au cours de ce travail, nous avons voulu savoir si la flagelline de *Brucella melitensis* 16M pouvait être un PAMP utilisé par l'hôte pour contrôler l'infection. Ainsi, nous avons confirmé qu'une souche de *Brucella* ne produisant pas de flagelline (*B. melitensis* 16M *fliC::aphA4*) est hypervirulente à des temps tardifs d'infection en modèle murin. Par ailleurs, nous suggérons que cette virulence exacerbée n'est liée ni à un taux de croissance plus rapide ou à une meilleure capacité de réplication en cellule du mutant *fliC::aphA4* par rapport à la souche sauvage ni à un défaut d'activation du macrophage infecté. Bien qu'atypique et ne pouvant être reconnue par le TLR5, une analyse bioinformatique nous a permis de montrer que la flagelline de *Brucella* pourrait être un PAMP reconnu au moins par Naip5. Cependant, nous suggérons que la flagelline de *Brucella* ne puisse être capable d'activer l'inflammasome. En effet, nous avons montré d'une part que celle-ci n'est pas responsable de la cytotoxicité de ce pathogène lors de l'infection de macrophages *ex vivo* à haute dose infectante et d'autre part qu'elle n'est pas sécrétée par celui-ci *in vitro*.

Remerciements

(Namur, le 17 aout 2010, 23:54)

Tout d'abord, je tiens à remercier les professeurs Jean-Jacques Letesson, Xavier De Bolle et Jean-Yves Matroule pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire afin de réaliser ce mémoire. Un grand merci tout particulier au promoteur de ce travail, Jean-Jacques Letesson, pour m'avoir donné goût au monde de la microbiologie ainsi que pour son écoute, sa compréhension et sa présence quand le moment s'en est fait sentir.

Un tout grand merci à Matthieu pour m'avoir encadré et aidé au cours de cette année (+ 8 mois). Remerciement à ta patience au quotidien ainsi qu'à tes nombreux conseils 'scientifiques' endéans (mot mal utilisé) mes soucis de lenteurs. (PS : J'attends toujours ta dîme pour un poulet pané ainsi qu'une bouteille de coca de chez U&P)

Je tiens également à remercier l'ensemble des personnes que j'ai eu la chance de côtoyer au cours de ce mémoire dans l'Unité de Recherche en Biologie Moléculaire (et de GéMo bien entendu, aucune dichotomie n'est admise) pour leur gentillesse, leur écoute et leur disponibilité. Anne-Michèle, Fanélie, Julie, Maxime, Richard, Charles, Marie G, Sophie, Cécile, Marie DB, Michael, sans oublier les valeureux Christian, Monique, Rose-Ma et Mathieu, un giga merci à vous tous, pour l'ambiance, la gaieté et la bonne humeur quotidienne. Aurore, Mira, Marie-Alice et Dédé, merci à vous pour nos nombreuses discussions échangées durant nos 'pauses P3' ainsi que pour vos encouragements au cours de ces derniers mois. Un grand merci à l'ensemble de l'assemblée 'mémo' (cuvées 2009 et 2010). Thibault, merci pour les étalements (tu m'en dois toujours environ 380) ; c'est quand tu veux pour notre city trip à Köln !

Merci à l'ensemble de la communauté biologique estudiantine des FUNDP et plus particulièrement au quatuor Sébastien, Arnaud, Caro et Alizée pour votre amitié, votre soutien et l'ensemble des moments que nous avons passés au cours de ces années.

Je remercie également d'avance Mesdames M. Raes, P. Renard, C. Muys et K. Van van Doninck pour la lecture critique de ce mémoire.

Finalement, je tiens à remercier toute ma famille pour le soutien qu'elle m'a accordée durant ce mémoire ainsi qu'au cours de ces nombreuses années d'étude. Merci à toi, Nat, pour avoir toujours été à mes côtés et m'avoir supporté (tant bien que mal ^^) tout au long de ce périple. Je ne te serai jamais assez redevable de m'avoir 'botter les fesses' il y a 4 ans. Merci d'être près de moi et de veiller sur moi depuis 6 ans !

Grand-père, mon Bon-Papa, j'espère que de l'endroit où tu es, tu es fier de moi...tu me manques tellement...

TABLE DES MATIERES

Avant-propos.....	1
Introduction.....	2
A. À la base de la détection des pathogènes : le système immunitaire inné.....	3
1. Immunités innée et adaptative, un binôme complémentaire.....	3
2. Reconnaissance des pathogènes par le système immunitaire inné.....	4
2.1. Les Pathogen-Associated-Molecular-Patterns, des cibles de choix.....	4
2.2. Les Pattern-Recognition-Receptors, récepteurs de l'immunité innée.....	5
2.2.1. Les <i>Toll-like Receptors</i> , TLRs.....	5
2.2.2. Les <i>Nod-like Receptors</i> , NLRs.....	6
B. La reconnaissance de la flagelline par les PRR de l'immunité innée.....	7
1. La flagelline est le monomère du filament du flagelle bactérien.....	7
2. Reconnaissance extracellulaire de la flagelline par le TLR5.....	8
2.1. Base structurale de la reconnaissance de la flagelline par le TLR5.....	8
2.2. Voies de signalisation du TLR5.....	8
2.3. Contribution du TLR5 au cours de l'infection.....	9
3. Reconnaissance cytosolique de la flagelline par les NLRs, Naip5 et Ipaf.....	9
3.1. Base structurale de la reconnaissance de la flagelline par Ipaf et Naip5.....	10
3.2. Voies de signalisation de Naip5 et Ipaf.....	10
3.3. Contribution de Naip5 et Ipaf au cours de l'infection.....	11
4. Flagelline atypique et échappement.....	12
C. <i>Brucella</i> : De la furtivité à la chronicité.....	13
1. Le genre <i>Brucella</i> , espèces et pathologie.....	13
2. <i>Brucella</i> : un stratège furtif.....	13
2.1. Persistance au sein des phagocytes professionnels et non-professionnels.....	14
2.2. Manipulation du trafic intracellulaire pour l'atteinte de sa niche de réplication.....	14
2.2.1. Importance de son LPS.....	15
2.2.2. Rôle du système à deux composants BvrS/BvrR.....	15
2.2.3. Implication d'un sucre, le β -1-2 glucane cyclique.....	15
2.2.4. Un acteur tardif, l'opéron virB.....	16
2.3. Un don inné pour tempérer l'activation de la réponse immunitaire de l'hôte.....	16
2.3.1. Le LPS et les lipoprotéines, des PAMPs non-conventionnels.....	17
2.3.2. Omp25, Omp31 et Btp1.....	18
D. <i>Brucella</i>, son système flagellaire.....	20
1. Ce que l'analyse du génome de <i>B. melitensis</i> 16M nous a appris.....	20
2. <i>Brucella melitensis</i> 16M produit un flagelle gainé.....	20
3. Le flagelle de <i>Brucella</i> , un système régulé.....	20
3.1. VjbR et FtcR, deux régulateurs transcriptionnelles.....	20
3.2. FliB et FlaF, deux régulateurs post-transcriptionnels de <i>fliC</i>	21
4. <i>Brucella</i> recourt à son flagelle pour persister dans son hôte : controverse.....	22

Objectif du mémoire.....	24
Résultats.....	26
A. Caractérisation de la souche <i>B. melitensis</i> 16M <i>fliC::aphA4</i> en modèle d'infection murin.....	27
1. Cinétique de virulence in vivo de la souche <i>B. melitensis</i> 16M <i>fliC::aphA4</i>	27
2. Analyse histologique de rates infectées par la souche <i>B. melitensis</i> 16M <i>fliC::aphA4</i>	28
B. Test de complémentation de <i>B. melitensis</i> 16M <i>fliC::aphA4</i> par le pMR10cat <i>pfliC-fliC-tfliC</i>.....	29
1. Construction du plasmide de complémentation « pMR10cat <i>pfliC-fliC-tfliC</i> ».....	29
1.1. Identification des séquences régulatrices du gène <i>fliC</i>	29
1.2. Amplification par PCR de la séquence <i>pfliC-fliC-tfliC</i>	29
1.3. Clonage de la séquence <i>pfliC-fliC-tfliC</i> dans le vecteur intermédiaire pGEM.....	31
1.4. Clonage de la séquence <i>pfliC-fliC-tfliC</i> dans le pMR10cat.....	31
2. Obtention de la souche <i>B. melitensis</i> 16M <i>fliC::aphA4</i> pMR10cat <i>pfliC-fliC-tfliC</i>	31
3. Cinétique de production de flagelline in vitro par la souche complémentée <i>B. melitensis</i> 16M <i>fliC::aphA4</i> pMR10cat <i>pfliC-fliC-tfliC</i>	31
4. Test de complémentation de <i>B. melitensis</i> 16M <i>fliC::aphA4</i> par le pMR10cat <i>pfliC-fliC-tfliC</i> en souris BALB/c.....	32
C. La flagelline de <i>B. melitensis</i> 16M serait un PAMP atypique : Analyse bioinformatique.....	33
D. Caractérisation de la croissance in vitro de la souche <i>B. melitensis</i> 16M <i>fliC::aphA4</i>.....	35
E. Caractérisation de la souche <i>B. melitensis</i> 16M <i>fliC::aphA4</i> en modèle d'infection cellulaire.....	36
1. Evaluation de la virulence de la souche <i>B. melitensis</i> 16M <i>fliC::aphA4</i> lors de l'infection de macrophages.....	36
2. Analyse du profil d'activation de macrophages infectés par la souche <i>B. melitensis</i> 16M <i>fliC::aphA4</i>	36
3. Analyse de la cytotoxicité de la souche <i>B. melitensis</i> 16M <i>fliC::aphA4</i>	38
F. Test de sécrétion in vitro de la flagelline de <i>B. melitensis</i> 16M.....	39
1. Construction du plasmide de surexpression « pBBRMCS-1 <i>pLac-fliC</i> ».....	39
1.1. Amplification par PCR et génération de l'insert <i>pLac-fliC</i>	39
1.2. Clonage de la séquence <i>pLac-fliC</i> dans le vecteur intermédiaire pGEM.....	40
1.3. Clonage de l'amplicon <i>pLac-fliC</i> dans le pBBRMCS-1.....	41
2. Obtention de la souche <i>B. melitensis</i> 16M pBBRMCS-1 <i>pLac-fliC</i>	41
3. Cinétique de production de flagelline in vitro par les souches de surexpression <i>B. melitensis</i> 16M pBBRMCS-1 <i>pLac-fliC</i>	41
4. Test de sécrétion in vitro de la flagelline chez <i>B. melitensis</i> 16M.....	41

Discussion et Perspectives.....43

- Une souche de *B. melitensis* 16M ne produisant pas de flagelline présente une virulence exacerbée en modèle d'infection murin.....45
- La flagelline de *B. melitensis* 16M, un PAMP ?.....46
- La flagelline de *B. melitensis* 16M n'activerait pas l'inflammasome.....47
- L'absence de flagelline déclencherait-elle une réponse immunitaire biaisée chez l'hôte murin lors de l'infection ?.....48
- *B. melitensis* 16M produit-elle de la flagelline lors de l'infection de macrophages ?.....49

Matériel et Méthodes.....51

A. Souches bactériennes, souris, plasmides et cellules.....52

1. Souches bactériennes.....52
2. Souris.....52
3. Plasmides.....52

B. Milieux de culture.....53

1. Milieux de culture riche pour *E. coli* : milieu Luria Bertani (LB).....53
2. Milieux de culture riche pour *B. melitensis* 16M: milieu 2YT.....53
3. Milieux de culture pour l'étude de la croissance de *B. melitensis* 16M *in vitro*.....53
4. Milieu de culture pour les cellules HeLa : milieu RPMI.....54
5. Milieu de culture pour les cellules RAW 264.7 : milieu DMEM.....54

C. Antibiotiques, tampons et solutions.....54

1. Antibiotiques.....54
2. Tampons et solutions.....54
 - 2.1. Tampons relatifs à l'extraction d'ADN plasmidique.....54
 - 2.2. Tampons relatifs à l'analyse de l'expression d'une protéine par Western Blot.....55
 - 2.3. Tampons divers.....55

D. Techniques relatives à l'utilisation d'ADN.....56

1. PCR (Polymerase Chain Reaction).....56
2. Extraction d'ADN plasmidique (Miniprep).....57
3. Restriction d'ADN plasmidique et ligation.....58
4. Purification sur colonne.....58
5. Electrophorèse sur gel d'agarose.....59

E. Techniques relatives aux protéines.....59

1. Analyse de l'abondance d'une protéine par Western Blot.....59
2. Analyse de l'abondance d'une protéine dans le surnageant d'une culture bactérienne.....62

F. Techniques relatives à l'utilisation de bactéries.....62

1. Transformation par choc thermique.....62
2. L' α -complémentation.....63
3. Conjugaison.....63
4. Analyse de la croissance bactérienne *in vitro* – BioScreen.....64

G. Techniques relatives à l'utilisation de *Brucella* en infection.....64

1. Infection de cellules par *Brucella melitensis* 16M.....64
2. Infection de souris par *Brucella melitensis* 16M.....66

Bibliographie.....65

Liste des abréviations

BCV	<i>Brucella-containing vacuole</i>
BIR	<i>Baculovirus Iap (inhibitor of apoptosis protein) Repeat</i>
BvrR/S	Système de régulation à deux composants chez <i>Brucella</i>
CARD	<i>Caspase Recruitment Domain</i>
CFU	<i>Colony Forming Unit</i>
DAMP	<i>Damaged-Associated Molecular Pattern</i>
DO	Densité optique
FBS	Sérum de veau fœtal (<i>Fœtal Bovine Serum</i>)
FtcR	<i>Flagellar two-component regulator</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
IFN	Interféron
iNOS	<i>inducible Nitric Oxyde Synthase</i>
IL	Interleukine
IPAF	<i>ICE Protease Activating Factor</i> , sous-famille de NLR
Ipaf	<i>ICE Protease Activating Factor</i> , NLR de la sous-famille IPAF
LPS	Lipopolysaccharide
LRR	Répétition riche en leucine (<i>Leucine Rich Repeat</i>)
MOI	<i>Multiplicity Of Infection</i>
MyD88	<i>Myeloid Differentiation factor 88</i>
Naip5	<i>Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein 5</i> , NLR de la sous-famille IPAF
NF-κB	<i>Nuclear Factor κB</i> , facteur de transcription
NK	Cellule ‘ <i>Natural Killer</i> ’
NLR	<i>Nod-like Receptors</i>
NOD	<i>Nucleotide binding and Oligomerization Domain</i>
Omp	<i>Outer-Membrane Protein</i>
ORF	Phase ouverte de lecture (<i>Open Reading Frame</i>)
PAMP	<i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PMN	Neutrophile polymorphonucléaire
PRR	<i>Pattern-Recognition Receptor</i>
RBS	Site de liaison du ribosome (<i>Ribosome Binding Site</i>)
STM	<i>Signature-Tagged Mutagenesis</i>
TIR	<i>Toll/Interleukin-1 Receptor</i>
TLR	<i>Toll-like Receptor</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
T3SS/T4SS	Système de sécrétion de type III et IV
Vjbr	<i>Vacuolar hijacking Brucella regulator</i>

Ohne dich kann ich nicht sein
Ohne dich
Mit dir bin ich auch allein
Ohne dich
Ohne dich
Ohne dich zähl ich die Stunden

Sans toi je ne peux pas être
Sans toi
Avec toi je suis seul aussi
Sans toi
Sans toi
Sans toi je compte les heures

Rammstein , *Ohne dich* (2004)

Avant-propos

Depuis les prémices de la vie sur Terre, les procaryotes n'ont cessé de coloniser les milieux les plus invraisemblables et improbables. En effet, ceux-ci ont trouvé refuge des océans les plus profonds jusqu'aux nuages les plus hauts, en passant par les endroits aux conditions les plus extrêmes, des terres les plus radioactives aux cheminées hydrothermales sous-marines les plus chaudes. Parmi les milliers de biomes que les bactéries ont côtoyés depuis leur apparition, on retrouve une multitude d'organismes eucaryotes, avec lesquels divers types d'interaction se sont développés. Ces associations sont communément répertoriées en trois catégories majeures : la symbiose (interaction bénéfique aux deux partenaires), le commensalisme (association bénéfique uniquement pour la bactérie, sans porter atteinte à l'hôte) et la pathogénie (interaction où la bactérie survit et se multiplie au détriment de son hôte). Bien que pouvant paraître unilatérale, l'association entre un hôte et un pathogène donné s'avère relativement complexe et se caractérise par un 'dialogue' des plus sophistiqués. Celui-ci met en jeu d'une part les moyens de détection et de défenses immunitaires de l'hôte et d'autre part, l'arsenal permettant au pathogène d'envahir celui-ci, de s'y maintenir et de se multiplier. Ainsi, face à l'apparition de bactéries pathogènes de plus en plus résistantes aux traitements antibiotiques, la compréhension des mécanismes à la base de ce dialogue représente la clé de voute dans le cadre de la recherche et de la découverte de nouveaux moyens thérapeutique visant à combattre celles-ci.

Dans l'introduction de ce travail, nous allons tout d'abord décrire brièvement les caractéristiques principales du système immunitaire dans le cadre de la reconnaissance des pathogènes au cours de l'infection. Ensuite, nous nous focaliserons sur la détection par le système immunitaire d'une protéine particulière, la flagelline. Puis, nous décrirons *Brucella melitensis* 16M et exposerons les différentes stratégies qu'elle utilise afin de duper les défenses immunes de son hôte et d'assurer sa survie au sein de celui-ci. Finalement, nous clôturerons l'introduction par une présentation détaillée du flagelle de *Brucella melitensis* 16M.

Introduction

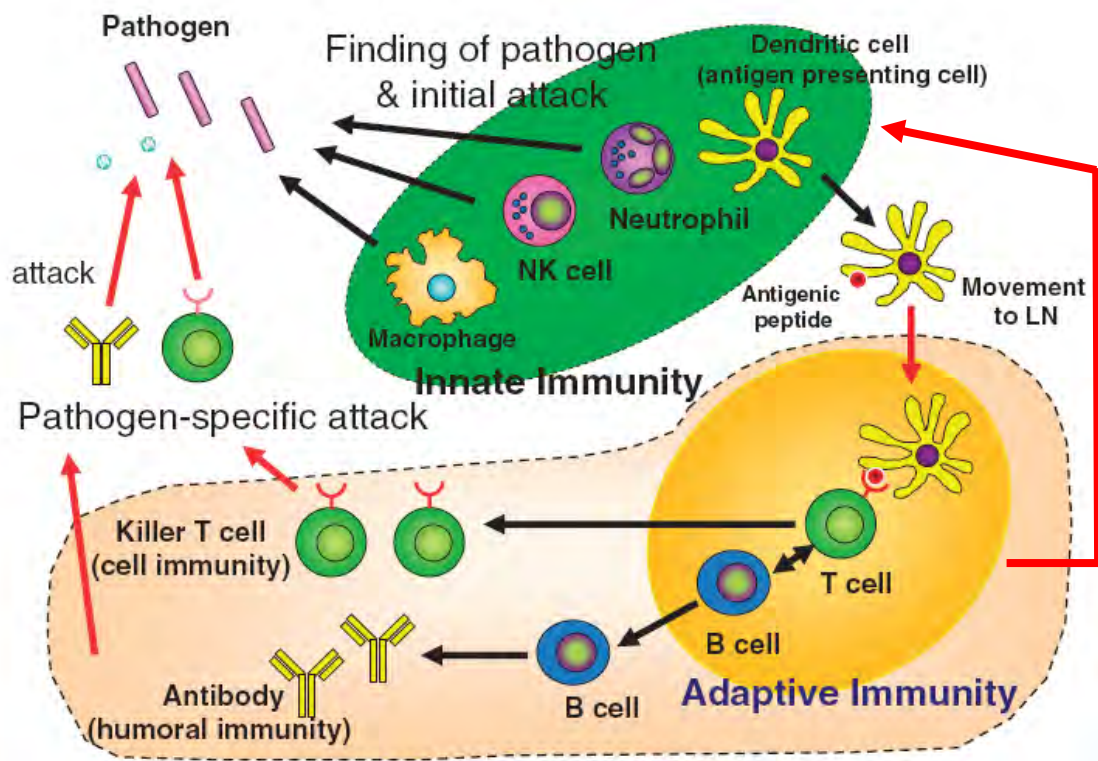


Figure 1. Schéma illustrant la complémentarité des systèmes immunitaires inné et adaptatif (adapté de Akira, 2009). L'invasion d'un organisme par un pathogène est d'abord prise en charge par les différents acteurs de l'immunité innée (en vert), comme les macrophages, les cellules Natural Killer (NK), les neutrophiles ou encore les cellules dendritiques. Ceux-ci ont pour rôle de trouver le pathogène, de le reconnaître et d'initier les premiers mécanismes de défense contre celui-ci. La cellule dendritique représente le pivot de la réponse immune globale en réalisant le lien entre ses deux composantes. En effet, une fois le pathogène reconnu, elle va informer les acteurs de l'immunité adaptative, les lymphocytes T et B, de la présence ainsi que de la nature de celui-ci. En réponse, le système adaptatif produit des effecteurs spécifiques à la lutte contre le pathogène impliqué (notamment des anticorps) et renforce la stimulation de la réponse innée. En interagissant de la sorte, immunité innée et immunité adaptative permettent à l'hôte de lutter de manière optimale face aux pathogènes.

Introduction

A. À la base de la détection des pathogènes : le système immunitaire inné

1. *Immunités innée et adaptative, un binôme complémentaire*

De par leurs caractéristiques physico-chimiques intrinsèques, les êtres vivants constituent pour bon nombre de microorganismes des environnements relativement riches en nutriments, et donc des niches susceptibles d'assurer la survie, la croissance ainsi que la multiplication de ceux-ci (Medzhitov 2007). Afin de lutter contre ces envahisseurs potentiellement néfastes à leur intégrité, les organismes eucaryotes multicellulaires disposent d'un ensemble de mécanismes protecteurs. Ceux-ci sont capables de discriminer les entités du soi non-infectieux de celles du non-soi infectieux, afin de permettre la destruction de ces dernières, tout en tolérant les premières. L'ensemble des constituants de l'organisme (molécules, cellules, tissus ou organes) participant à cette lutte défensive coordonnée forment le système immunitaire.

D'un point de vue évolutif, il convient de subdiviser ce système en deux composantes distinctes, l'immunité innée et l'immunité adaptative. L'immunité innée représente en effet un système de défense très ancien, phylogénétiquement parlant, que l'on retrouve chez presque tous les organismes métazoaires. Il forme par ailleurs le système de défense exclusif des plantes et des arthropodes (Janeway and Medzhitov 2002). Le système immunitaire adaptatif, quant à lui, serait apparu avec les premiers vertébrés (Hoffmann, Kafatos et al. 1999; Takeda and Akira 2003).

Les deux sous-systèmes immunitaires se distinguent également par leur modalité d'action. En effet, la réponse innée s'avère immédiate ; elle ne présente aucune latence étant donné que ces différents acteurs, tant moléculaires que cellulaires, préexistent à l'invasion au niveau de régions stratégiques de l'organisme susceptibles d'être plus vite infectées que d'autres par des microorganismes. Cette réponse est également dite 'non-spécifique' étant donné que son activation résulte de la reconnaissance de motifs moléculaires représentatifs de groupes de pathogènes (**cfr. section A.2. de l'introduction**). Elle ne présente par ailleurs pas de mémoire à long terme. La réponse adaptative, quant à elle, s'adapte au pathogène et nécessite une phase de latence de quelques jours avant d'être opérationnelle. Ses effecteurs centraux sont les lymphocytes T et B, issus d'un même précurseur de la moelle osseuse. Cette réponse est décrite comme 'spécifique', de par l'intervention d'une pléiade de récepteurs antigéniques distincts, fruit de réarrangements au niveau génomique. De plus, une fois l'organisme venu à bout de l'infection, une partie des lymphocytes activés au cours de la réponse adaptative survit et se différencie en cellules mémoires, spécifiques à l'antigène rencontré. Si l'organisme se retrouve confronté par la suite à ce même antigène, cette population de lymphocytes mémoires permettra de fournir une réponse immunitaire plus rapide et plus efficace contre le pathogène impliqué.

Pendant longtemps, de par leurs divergences décrites ci-dessus, ces deux systèmes ont été perçus comme deux entités distinctes, agissant de manière indépendante et non coordonnée. Ainsi, l'immunité innée était considérée comme un système rudimentaire car peu spécifique. Supposée n'intervenir qu'au début de l'invasion du pathogène, son but n'était pas

Nature des PAMPs	Classe de pathogènes	Description
PAMPs de nature nucléique		
CpG-DNA	Protozoaires, Bactéries et virus	A l'inverse des eucaryotes, l'ADN des bactéries et des virus est riche en îlots CpG non-méthylés
ARN simple-brin	Virus	Les virus à ARN simple-brin ont souvent un génome enrichi en uridine et/ou guanosine
ARN double-brin	Virus	L'ARN double-brin est souvent produit lors de la réplication des virus à ARN simple-brin
PAMPs de nature protéique		
Flagelline	Bactéries	La flagelline est le monomère permettant de former le filament du flagelle de certaines bactéries
Protéines d'enveloppe virales	Virus	Protéines retrouvées en surface des virus enveloppés
PAMPs de nature lipidique et/ou saccharidique		
Peptidoglycan	Bactéries gram-négative/positives	Le peptidoglycan forme une structure macromoléculaire de la paroi des bactéries. Il est composé de longues chaînes glycosidiques (alternance d'acide N-acétyl muramique et de N-acétyl glucosamine) pontées entre elles par des liens tétrapeptidiques. La nature du troisième acide aminé du lien dépend du type de bactérie, gram-négative ou positive
Lipide A du lipopolysaccharide (LPS)	Bactéries gram-négatives	Le LPS est un composant de la membrane externe des bactéries gram-négatives. Il possède trois domaines distincts; le lipide A, le core et la chaîne O
Acide lipothéichoïque (LTA)	Bactéries gram-positives	Polymère de nature saccharidique retrouvé au sein de la paroi des bactéries gram-positives et contribuant à la rigidité de celle-ci
Lipoarabinomannane (LAM)	Mycobactéries	Constituant de la paroi des mycobactéries
Mannose	<i>Fungi</i> , bactéries, virus, parasites	Sucre couramment rencontré dans les glycoprotéines et glycolipides de microorganisme
β -glucanes	<i>Fungi</i>	Polysaccharides constitutifs de la paroi fongique
PAMP de nature cristalline		
Hémozoïne	Protozoaire (<i>Plasmodium</i>)	Produit de dégradation de l'hémoglobine

Tableau 1 : Illustration de quelques exemples de PAMPs. Cette planche reprend, en fonction de leur nature, les principaux ligands reconnus par les récepteurs de l'immunité innée. Tous les PAMPs décrits ci-dessus, sauf l'hémozoïne, représentent des structures indispensables à la survie des pathogènes qui les présentent.

de venir à bout de l'infection mais bien de contenir le microorganisme au site infecté afin de permettre la mise en place de la 'vraie' réponse immunitaire, adaptative cette fois.

Cependant, bien que des évidences aient démontré leur intervention temporellement distincte, il apparaît actuellement que les systèmes innés et adaptatifs sont étroitement interconnectés tout au long de la réponse immune (**Fig. 1**). En effet, chez les vertébrés, en plus de son rôle de contention au début de l'infection, le système immunitaire inné est capable de stimuler et orienter la réponse immunitaire adaptative apparaissant plusieurs jours après le début de l'infection. En retour, l'immunité adaptative restimule et renforce les mécanismes de l'immunité innée afin de venir à bout du pathogène de manière concertée (Palm and Medzhitov 2009). Ces deux systèmes forment ainsi un couple idéal pour combattre les pathogènes, grâce à des stratégies différentes mais complémentaires.

Longtemps laissée pour compte, l'importance du système immunitaire inné dans la détection des pathogènes ainsi que dans l'orientation globale de la réponse immune est aujourd'hui reconnue.

2. Reconnaissance des pathogènes par le système immunitaire inné

Le système immunitaire inné, en tant que première ligne de défense de l'hôte, forme une interface importante entre les pathogènes et les mécanismes effecteurs destinés à les éliminer. En effet, son activation va permettre de confiner l'agent pathogène au site infectieux, de lutter directement contre celui-ci mais également de conditionner le devenir de la réponse immunitaire globale. La clé de l'activation du système immunitaire inné est directement liée à sa capacité à discriminer le soi non-infectieux et le non-soi infectieux (Palm and Medzhitov 2009). Pour ce faire, en réponse à la pression constante imposée par les pathogènes, une série de récepteurs capables de reconnaître des motifs structuraux de ceux-ci, ont été sélectionnés chez les organismes hôtes. Ces récepteurs sont appelés '*Pattern-Recognition-Receptors*' (PRRs) et leurs ligands '*Pathogen-Associated-Molecular-Patterns*' (PAMPs) (Janeway and Medzhitov 2002).

2.1. Les Pathogen-Associated-Molecular-Patterns, des cibles de choix

Les PAMPs détectés par les récepteurs de l'immunité innée sont des motifs moléculaires hautement conservés de microorganismes (Janeway and Medzhitov 2002; Uematsu and Akira 2006a). Ceux-ci ne sont pas présents chez l'organisme hôte. Les PAMPs sont peu variables, car essentiels à la survie microbienne, et sont partagés par des classes de pathogènes donnés (Medzhitov 2007). Ces structures sont diverses et peuvent être classées selon leur nature lipidique, protéique, saccharidique ou encore nucléique (**Tableau 1**).

Les PAMPs étant présents chez tous les microorganismes (et donc ceux de la flore commensale intestinale, par exemple), le système immunitaire inné détecte également d'autres 'signaux', souvent associé aux processus infectieux, afin de discriminer les agents pathogènes et non-pathogènes (Vance, Isberg et al. 2009). Par exemple, il a été suggéré que les cellules infectées en nécrose pouvaient libérer diverses molécules dans le milieu extracellulaire (comme de l'acide urique, de l'ATP ou encore de l'ADN) pouvant être également perçues par des PRRs (Kono and Rock 2008). Ces molécules sont reprises dans la littérature sous le nom de DAMPs, pour *Damaged-Associated-Molecular-Pattern*. Selon la

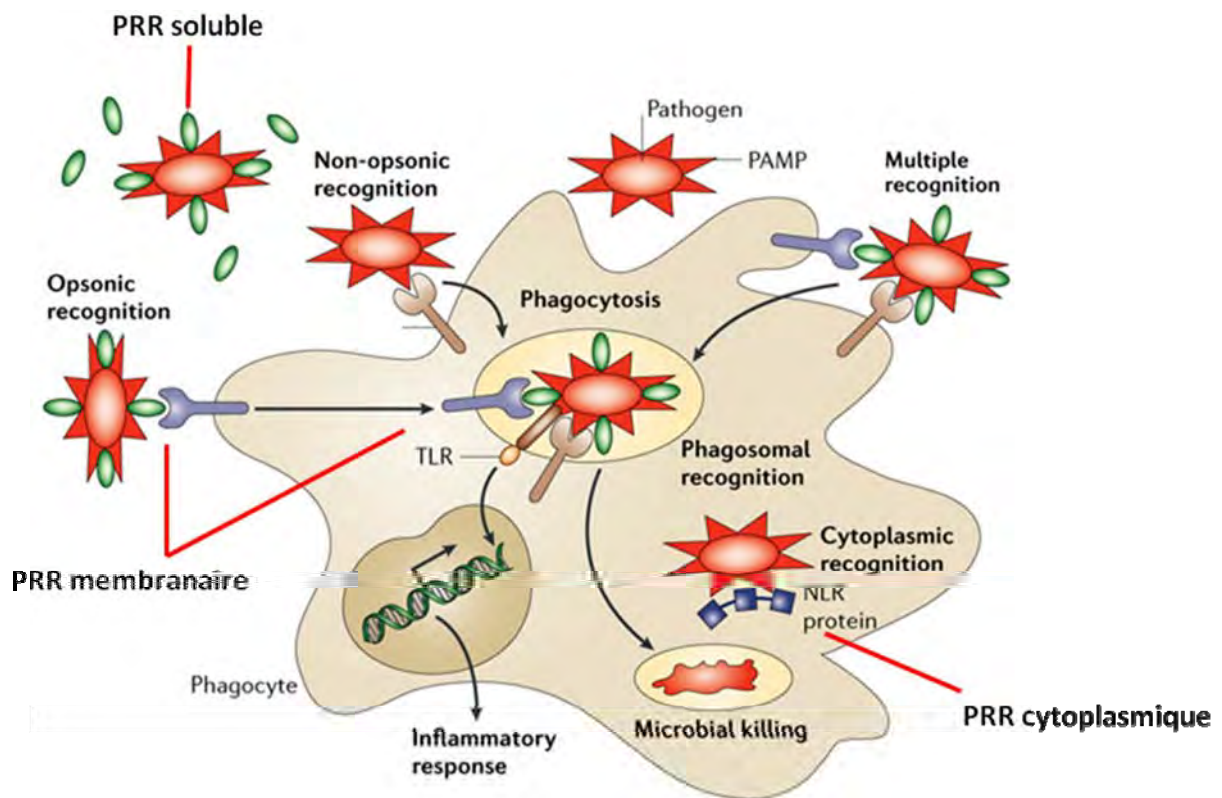


Figure 2. Représentation générale des récepteurs de l'immunité innée participant à la reconnaissance d'un pathogène (adapté de Brown, 2006). Lors de l'infection d'un hôte par un pathogène (en rouge), une réponse immune va être initiée grâce à la reconnaissance de certains de ses PAMPs par divers PRRs de l'immunité innée. Cette détection peut se faire au sein des fluides tissulaires ou bien dans le sang par l'intermédiaire de PRRs solubles (en vert). Le pathogène peut également être reconnu par des PRRs situées en membrane. Alors que les PRRs situés à la surface de la cellule permettent de reconnaître les PAMPs présents dans le milieu extracellulaire, ceux localisés au sein de la membrane des endosomes permettent à l'hôte de détecter des PAMPs internalisés. De plus, on retrouve également des PRRs cytosoliques. Pour un pathogène donné, plusieurs de ses PAMPs sont détectés par plusieurs PRRs qui, de concert permettent de donner lieu à la réponse immune la plus adaptée à la lutte contre celui-ci. Comme on peut le voir sur ce schéma, les deux réponses effectrices majeures découlant de la reconnaissance d'un pathogène sont la phagocytose et l'établissement d'une réponse inflammatoire.

‘théorie du danger’ émise par Matzinger en 1994, l’initiation de la réponse immune se baserait à la fois sur la détection de signaux de types PAMPs et de DAMPs, les seconds servant davantage à informer l’hôte sur le contexte de l’infection. Les DAMPs pourraient être produits après la reconnaissance de PAMPs et former un ensemble de médiateurs destinés à la mise en place de la réponse immune au cours de l’infection (Matzinger 1994).

2.2. Les Pattern-Recognition-Receptors, récepteurs de l’immunité innée

Le système immunitaire inné est doté d’une variété de récepteurs capable de reconnaître les PAMPs, les Pattern-Recognition-Receptors (PRRs). Ceux-ci, encodés dans la lignée germinale, peuvent être cytoplasmiques, membranaires ou encore retrouvés directement dans la circulation sanguine ou au sein des fluides tissulaires (**Fig. 2**).

Les PRRs membranaires et cytoplasmiques sont exprimés de manière différentielle par divers types cellulaires de l’immunité innée, comme les polymorphonucléaires neutrophiles (PMN), les cellules mastocytaires, les éosinophiles, les cellules Natural Killers (NK), les macrophages ainsi que les cellules dendritiques. Ils sont aussi produits par les lymphocytes T et B de l’immunité adaptative. Par ailleurs, ces PRRs peuvent être également exprimés par des cellules n’appartenant pas au système immunitaire, telles les cellules endothéliales, épithéliales, ou encore musculaires lisses (Janeway and Medzhitov 2002; Parker, Prince et al. 2007).

Les PRRs jouent un rôle important dans le développement et le contrôle de la réponse immunitaire adaptative. Ils permettent de déterminer la nature de l’antigène reconnu, le type d’agent infectieux (groupe de pathogènes), la durée et l’ampleur de l’infection ainsi que la nécessité de produire des cellules mémoires (Palm and Medzhitov 2009).

Les trois classes de PRRs les plus abondamment décrites dans la littérature sont les RLRs, impliqués dans la reconnaissance cytoplasmique d’acides nucléiques viraux, les TLRs et les NLRs. Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes focalisés sur les TLRs et les NLRs, deux classes de PRRs dont certains représentants reconnaissent la flagelline. Une brève description de ces deux classes de PRRs sera donnée dans les deux sections suivantes (**cfr. sections A.2.2.1. et A.2.2.2.**) tandis que les mécanismes à la base de la détection de la flagelline (reconnaissance et voies de signalisation) seront décrits dans le ‘**chapitre B**’ de cette introduction.

2.2.1. Les Toll-like Receptors, TLRs

Les TLRs sont des PRRs membranaires exprimés soit au niveau de la membrane d’une vacuole, où ils permettent de détecter des PAMPs internalisés par la cellule, soit au niveau de la membrane plasmique, où ils permettent de détecter des PAMPs extracellulaires (Uematsu and Akira 2006b). La famille des TLRs mammaliens compte actuellement 12 membres différents (Akira 2009; Kawai and Akira 2009). Le **tableau 2** propose une liste des principaux ligands de chaque TLR, ainsi que des pathogènes qui les exposent.

Ces récepteurs sont des glycoprotéines transmembranaires de type I et présentent une structure tripartite (**Fig. 3**). En effet, chaque TLR possède un domaine amino-terminal extracellulaire, comportant un nombre variable (16 - 28) de répétitions riches en leucine

TLR	Location of TLR	PAMPs recognized by TLR	Co-receptor (s)
TLR1/2	Plasma membrane (cell surface)	Triacyl lipopeptides (Bacteria and Mycobacteria)	Hetrodimer of TLR1/2 forms a functional receptor CD36, RP105
TLR2	Plasma membrane (cell surface)	Peptidoglycan (Gram-positive bacteria), LAM (Mycobacteria), Hemagglutinin (Measles virus), phospholipomannan (<i>Candida</i>), Glycosylphosphatidyl inositol mucin (<i>Trypanosoma</i>)	
TLR3	Endosome	ssRNA virus (WNV), dsRNA virus (Reovirus), RSV, MCMV	
TLR4	Plasma membrane (cell surface)	LPS (Gram-negative bacteria), Mannan (<i>Candida</i>), Glycoinositolphospholipids (<i>Trypanosoma</i>), Envelope proteins (RSV and MMTV)	MD2, CD14, LBP, RP105
TLR5	Plasma membrane (cell surface)	Flagellin (Flagellated bacteria)	
TLR6/2	Plasma membrane (cell surface)	Diacyl lipopeptides (Mycoplasma), LTA (Streptococcus), Zymosan (<i>Saccharomyces</i>)	
TLR7	Endosome	ssRNA viruses (VSV, Influenza virus)	Hetrodimer of TLR6/2 or dectin-1 forms a functional receptor
TLR8 [#]	Endosome	ssRNA from RNA virus	
TLR9	Endosome	dsDNA viruses (HSV, MCMV), CpG motifs from bacteria and viruses, Hemozoin (Plasmodium)	
TLR11 [*]	Plasma membrane (cell surface)	Uropathogenic bacteria, profilin-like molecule (<i>Toxoplasma gondii</i>)	

Tableau 2. Liste reprenant les principaux PAMPs identifiés des TLRs, ainsi que les classes de microorganismes qui les portent (adapté de Kumar et al., 2009). Le TLR2 peut former des hétérodimères respectivement avec les TLR1 et TLR6. Les deux couples résultants permettent de reconnaître des PAMPs différents. De plus, certains TLRs, comme le TLR4, ont besoin de la présence de co-récepteurs afin d’être activés. Le TLR11, exprimé chez la souris, est supposé non-fonctionnel chez l’humain de par la présence d’un codon stop (mutation non-sens).

(LRR, Leucin-Rich Repeats), impliqué dans la reconnaissance du ligand. Chaque motif LLR se compose de 20 à 30 acides aminés et présente un pattern conservé 'LxxLxLxxN'. Une région transmembranaire sépare le domaine extracellulaire d'un domaine carboxy-terminal intracytoplasmique, le domaine TIR (Toll/IL-1 Receptor). Ce dernier permet de recruter par interaction homotypique des protéines adaptatrices cytoplasmiques. La reconnaissance d'un PAMP par son TLR et l'activation des protéines adaptatrices permet de déclencher une cascade signalétique grâce au recrutement successif de diverses protéines (Uematsu and Akira 2006b). Au final, cette cascade de transduction du signal déclenche les réponses de défense de l'hôte contre l'agent infectieux reconnu, impliquant notamment la production de peptides antimicrobiens ainsi que la production de protéines médiatrices comme des molécules costimulatrices, des chémokines ou encore des cytokines (Kumar, Kawai et al. 2009).

2.2.2. *Les Nod-like Receptors, NLRs*

Les Nod-like Receptors (NLRs) sont une famille de PRRs cytoplasmiques. Ces récepteurs possèdent trois domaines caractéristiques. Tout d'abord, un domaine LRR carboxy-terminal qui, comme pour les TLRs, est impliqué dans la reconnaissance du ligand. Ensuite, on retrouve un domaine central NOD (Nucleotide binding and Oligomerization Domain), également connu comme le domaine NACHT, capable d'oligomériser par interaction homotypique et nécessaire à l'activation du récepteur. Les NLRs possèdent également un domaine amino-terminal effecteur, capable d'interagir avec d'autres protéines par interaction homotypique. Ce dernier domaine peut être de type CARD (Caspase Recruitment Domain), PYD (PYrin Domain) ou BIR (Baculovirus Iap (inhibitor of apoptosis protein) Repeat) (Uematsu and Akira 2006b; Delbridge and O'Riordan 2007). A l'heure actuelle, cette famille de récepteurs est subdivisée, sur base de la nature du domaine amino-terminal, en quatre sous-familles majeures : NOD, NALP (NACHT - LRR- and pyrin domain – containing proteins), IPAF (ICE protease activating factor) et CIITA (Class II TransActivator) (Benko, Philpott et al. 2008) (**Fig. 4**).

En plus d'être classés sur base de leur structure, les NLRs peuvent être également distingués en fonction de la réponse induite en aval de leur activation. En effet, une fois activés, les récepteurs NOD1 et NOD2 de la sous-famille NOD, capables de reconnaître des produits de dégradation du peptidoglycan (Martinon, Mayor et al. 2009), activent le facteur de transcription NF- κ B, régulant à son tour la production de molécules pro-inflammatoires (**Fig. 5**). Par contraste, les NLRs appartenant aux sous-familles NALP et IPAF, senseurs d'une pléiade de stimuli différents, donnent lieu une fois activé à la formation d'un complexe macromoléculaire pro-inflammatoire nommé l'inflammasome (**cfr. section 4.2. du chapitre B**) (Delbridge and O'Riordan 2007; Yu and Finlay 2008).

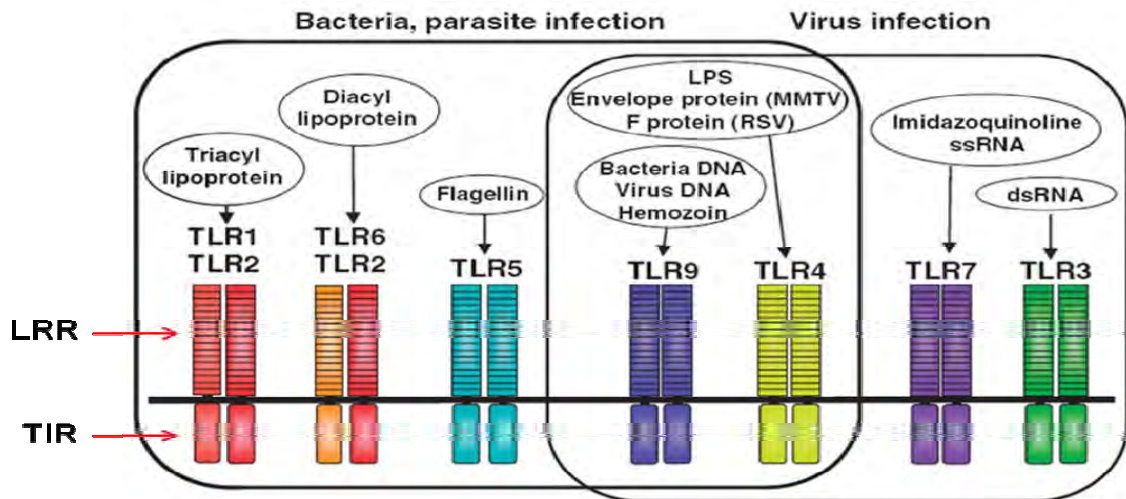


Figure 3. Illustration schématique de la structure des TLRs (adapté de Akira, 2009). Les TLR sont des récepteurs transmembranaires dotés d'une structure tripartite. Ils possèdent tous un domaine LRR extracellulaire destiné à la reconnaissance de leur(s) PAMP(s), un domaine transmembranaire et un domaine TIR intracytosolique, capable d'interagir avec différentes protéines adaptatrices une fois le récepteur activé.

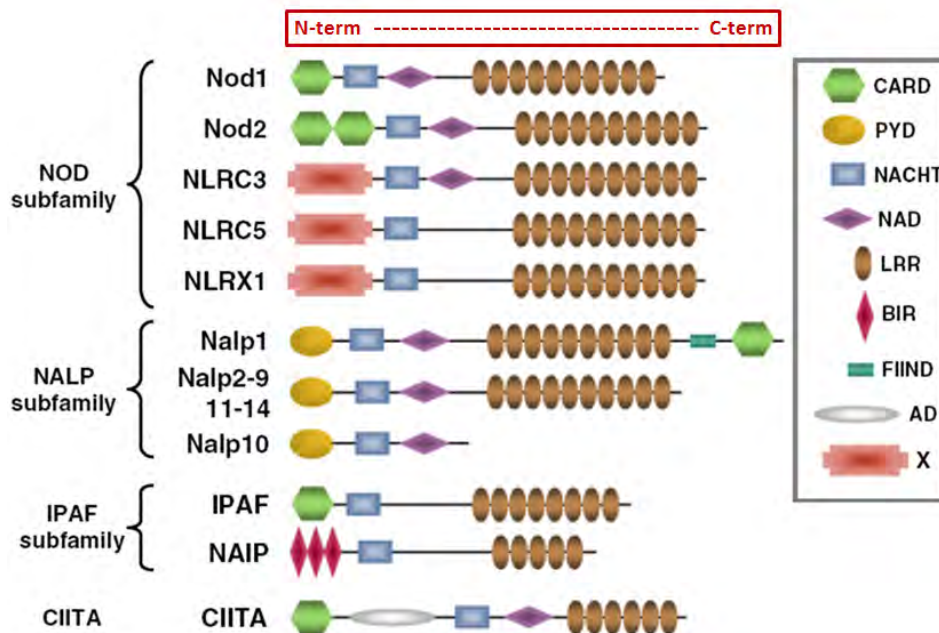


Figure 4. Illustration des différents PRRs membres de la famille des NLRs (d'après Benko, 2008). Les membres de la famille NLRs se répartissent en 4 sous-familles sur base de la nature de leur domaine amino-terminal.

CARD, caspase-recruitment domaine ; **PYD**, pyrin domaine ; **NOD**, nucleotide binding and oligomerization domaine ; **NAD**, Nacht-associated domaine ; **LRR**, leucine-rich repeat ; **BIR**, baculovirus IAP (inhibitor of apoptosis protein) repeat ; **FIIND**, domaine with function to find ; **AD**, activation domaine ; **NALP**, Nacht - LRR- and pyrin domaine – containing proteins ; **IPAF**, ICE-protease activating domaine ; **CIITA**, class II transactivator ; **X**, attribué aux NLRs dépourvus de domaine N-terminal bien défini.

B. La reconnaissance de la flagelline par les PRR de l'immunité innée

1. *La flagelline est le monomère du filament du flagelle bactérien*

Pour bon nombre d'espèces bactériennes, le flagelle représente une structure extracellulaire indispensable à leur survie car il leur permet de se mouvoir au sein de l'environnement et de coloniser leur hôte (**Fig. 6**). De nombreuses autres fonctions lui sont néanmoins attribuées. En effet, cet appendice permet également aux bactéries de pénétrer les muqueuses de l'organisme, d'adhérer à leur cellule hôte ainsi que d'envahir celle-ci (Ramos, Rumbo et al. 2004). Par ailleurs, le flagelle peut également servir de système de sécrétion pour des facteurs de virulence chez les bactéries pathogènes, comme il l'a été décrit chez *Yersinia enterocolitica* (Young, Schmiel et al. 1999).

Un flagelle se constitue de trois parties majeures (**Fig. 7**): le corps basal, le coude et le filament. Le corps basal, imbriqué au sein de la paroi bactérienne, contient notamment le moteur moléculaire responsable de la rotation du flagelle. Le coude, quant à lui, réalise le lien entre le corps basal et le filament, long tube cylindrique (10-15 μm) formé grâce à l'agencement hélicoïdal ordonné d'un monomère, la flagelline (Minamino, Imada et al. 2008).

L'assemblage de cet appendice extracellulaire est finement régulé (**Fig. 8**). En effet, les gènes flagellaires sont généralement répartis en trois classes transcriptionnelles distinctes. On retrouve des gènes de classe I, incluant des régulateurs transcriptionnels 'maîtres', des gènes de classe II, codant pour les constituants du corps basal et du coude ainsi que pour des régulateurs secondaires, et des gènes de classe III. Cette dernière catégorie reprend les gènes codant pour le moteur flagellaire, le système de chimiotactisme et la flagelline. Ainsi, de manière hiérarchisée, les gènes d'un niveau supérieur ne pourront être exprimés que si les gènes de la classe précédente auront été préalablement exprimés, respectant ainsi l'ordre d'assemblage logique du flagelle, du corps basal au filament (Chevance and Hughes 2008).

Très bien caractérisée chez *Salmonella typhimurium*, la flagelline, protéine formant le filament, a une structure tridimensionnelle ressemblant à la lettre grecque gamma ' Γ ' et est composée de 4 domaines différents (D0 à D3) (Yonekura, Maki-Yonekura et al. 2003) (**Fig. 9**). Les domaines D0 et D1 se composent de longues hélices- α et sont enfouis au centre du filament. Ils apparaissent par ailleurs très conservés chez de nombreuses espèces de bactéries et sont essentiels à l'assemblage et la mobilité du filament (Beatson, Minamino et al. 2006). Les domaines D2 et D3, quant à eux, sont globulaires et extrêmement variables d'une espèce bactérienne à l'autre. Ils se composent principalement de feuillets- β et sont exposés à la surface du filament, une fois celui-ci formé (Yonekura, Maki-Yonekura et al. 2003).

Par ailleurs, la flagelline bactérienne est un des rares PAMPs protéiques recensés à l'heure actuelle. Elle peut être détectée par le système immunitaire inné grâce à des PRRs transmembranaires (TLR5) et cytoplasmiques (Ipaf – Naip5) (Miao, Andersen-Nissen et al. 2007).

2. Reconnaissance extracellulaire de la flagelline par le TLR5

Le système immunitaire inné dispose du TLR5 (cfr. Toll-like Receptor) pour détecter la flagelline extracellulaire. Ce récepteur, respectant la structure canonique des TLRs, est exprimé par différents types cellulaires tels les monocytes (Hayashi, Smith et al. 2001), les cellules dendritiques immatures (Means, Hayashi et al. 2003) ou encore les cellules épithéliales (Cario and Podolsky 2000). Contrairement aux autres membres de la famille des TLRs, le TLR5 n'est pas exprimé par les macrophages et n'est plus exprimé par les cellules dendritiques matures (Means, Hayashi et al. 2003).

2.1. Base structurale de la reconnaissance de la flagelline par le TLR5

Smith et al. ont démontré, par mutagenèse dirigée, que les acides aminés de flagelline reconnus par le TLR5 se localisent au sein du domaine amino-terminal conservé D1 (centré autour des acides aminés 89 à 96). Ces acides aminés sont par ailleurs essentiels à l'assemblage et à la mobilité du filament (Smith, Andersen-Nissen et al. 2003; Andersen-Nissen, Smith et al. 2005). Cependant, étant donné que cette portion de la flagelline se situe à l'intérieur du filament, il est vraisemblable que le TLR5 reconnaisse des monomères de flagelline provenant, par exemple, du filament en élongation ou de la dépolymérisation de celui-ci (Miao, Andersen-Nissen et al. 2007).

2.2. Voies de signalisation du TLR5

Après reconnaissance de son ligand, le TLR5 forme un homodimère permettant à son domaine cytosolique TIR de recruter la protéine adaptatrice MyD88. Par la suite, une voie de transduction du signal dite 'MyD88-dépendante' est initiée (Miao, Andersen-Nissen et al. 2007) (**Fig. 10**). MyD88 permet, par interaction homotypique mettant en jeu son domaine DD réciproque (Death Domain), le recrutement de protéines IRAKs (IL-1 Receptor-Associated Kinase). Ainsi, les sérine/thréonine kinases IRAK4, IRAK1 et IRAK2 sont successivement activées par phosphorylation et permettent le recrutement de TRAF6 (Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor 6). Le complexe IRAKs/TRAF6 se détache alors de la membrane et interagit avec un autre complexe cytosolique composé des protéines TAK1 (TGF- β -Activated Kinase 1), TAB1 (TAK1-Binding protein 1) et TAB2 (TAK1-Binding protein 2). Cette interaction induit la phosphorylation et l'activation de TAK1, menant à l'activation des facteurs de transcription NF- κ B (via le complexe de kinases 'IKK') et AP-1 (via la voie des MAP kinases) (Uematsu and Akira 2006b; Akira 2009). Cette séquence d'événements aboutit à l'expression de gènes pro-inflammatoires codant pour des cytokines ou des chémokines. La réponse innée initiée par la détection de la flagelline extracellulaire est cependant différentes en fonction du type cellulaire considéré. Alors que les cellules épithéliales seront associées, après reconnaissance par le TLR5, à une production importante d'IL-8, les cellules dendritiques ainsi que les monocytes seront davantage associés à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoire, comme le TNF α ou l'IL-12. Comme les autres TLRs à voie 'MyD88-dépendante', le TLR5 active également la production des interleukines pro-IL-1 β et pro-IL-18 (Miao, Andersen-Nissen et al. 2007).

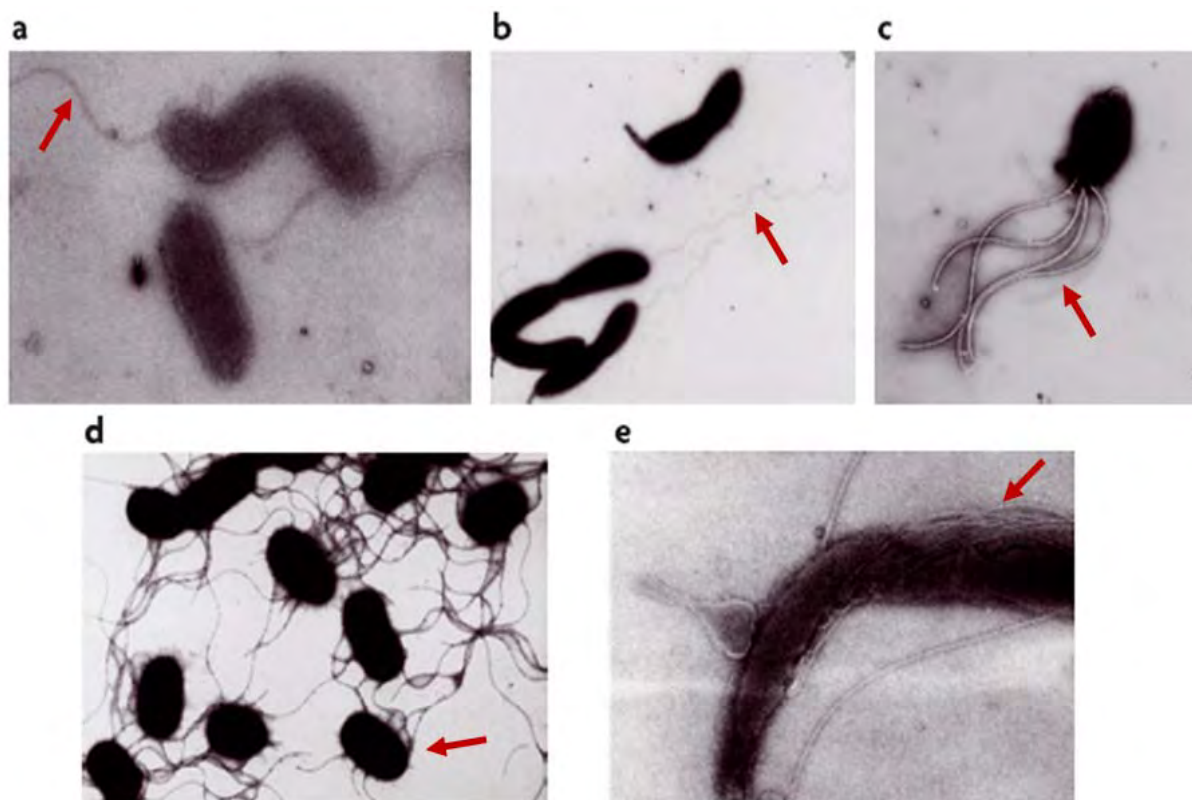


Figure 6. Illustration de différents types de flagelle (adapté de Chevance et al., 2008). Le flagelle bactérien peut avoir plusieurs rôles. Il peut servir d'organe locomoteur, d'appendice adhérent ou encore de système de sécrétion. De plus, il en existe plusieurs types. Par exemple, *Idiomarina loihiensis* (a) et *Caulobacter crescentus* (b) peuvent présenter un seul flagelle polaire (monotriche). Un grand nombre de bactéries possèdent également plusieurs flagelles à leur surface ; ceux-ci peuvent être soit regroupés à une des extrémités de la bactérie (lophotriche), comme décrit chez *Vibrio fischeri* (c), soit distribués sur tout le pourtour du microorganisme (péritriche), comme observé chez *Salmonella typhimurium* (d). Chez les spirochètes, notamment chez *Borrelia* (e), on retrouve un ensemble de flagelles localisés au sein de l'espace périplasmique ; la rotation de ceux-ci à l'unisson permet à la bactérie de se déplacer selon un mouvement apparenté à la tête d'une foreuse.

2.3. Contribution du TLR5 au cours de l'infection

De nombreuses études sur modèle murin ont permis de montrer le rôle important joué par le TLR5 au cours d'infection par des pathogènes flagellés.

Tout d'abord, Andersen-Nissen et al. ont mis en évidence le rôle bénéfique du TLR5 dans le contrôle de l'infection causée par une souche uropathogène d'*Escherichia coli*. En effet, des souris dépourvues de TLR5 sont incapables de développer une réponse inflammatoire précoce suffisamment importante au niveau de la vessie que pour lutter contre ce pathogène. Ainsi, l'incapacité de l'organisme à combattre l'infection engendre une augmentation conséquente de la charge bactérienne au niveau de la vessie (Andersen-Nissen, Hawn et al. 2007).

De plus, la caractérisation de souris TLR5^{-/-} montre également le rôle protecteur crucial de ce PRR dans le contrôle d'infection par voie intranasale de *Pseudomonas aeruginosa* et par voie intrapéritonéale de *Salmonella typhimurium* (Feuillet, Medjane et al. 2006).

Cependant, d'autres études ont démontré que l'activation du TLR5 pouvait avoir un impact négatif sur la capacité de la souris à combattre l'infection causée par une souche de *Salmonella typhimurium* administrée par voie orale. En effet, des souris TLR5^{-/-} montrent une meilleure capacité à survivre par rapport à des souris exprimant ce PRR, vraisemblablement en empêchant la dissémination du pathogène du système digestif vers les ganglions lymphatiques mésentériques (Uematsu, Jang et al. 2006).

De plus, des données montrent que *Salmonella typhimurium* est capable, après reconnaissance de lysophospholipides produits par les cellules épithéliales de l'intestin, d'augmenter la synthèse et la sécrétion de flagelline dans le milieu extracellulaire indépendamment de la formation du flagelle (Subramanian and Qadri 2006). Par ailleurs, il a été démontré que cette sécrétion de flagelline monomérique est responsable du recrutement de cellules inflammatoires (macrophages et cellules dendritiques immatures) au site infecté, après l'induction de la sécrétion de chémokines suite à sa reconnaissance par le TLR5 (Metcalf, Best et al.; Sierro, Dubois et al. 2001; Rhee, Keates et al. 2004). Dans le cadre de l'infection causée par *Salmonella typhimurium*, ce recrutement de cellules dendritiques immatures au site infecté pourrait lui fournir une niche propice à sa survie et à sa dissémination au sein de l'organisme hôte (Sierro, Dubois et al. 2001).

Comme le démontrent ces différentes études, l'activation du TLR5 au cours du processus infectieux peut être bénéfique ou défavorable pour l'hôte. Le rôle joué par le TLR5 semble donc dépendre de la souche infectieuse ainsi que du site d'infection.

Par ailleurs, une étude génétique réalisée par Hawn et al. sur différents échantillons sanguins humains a révélé que les individus exprimant un TLR5 tronqué non-fonctionnel (Polymorphisme TLR5^{392STOP}) étaient plus sensibles à une infection pulmonaire causée par *Legionella pneumophila* que les sujets disposant d'un TLR5 fonctionnel (Hawn, Verbon et al. 2003).

3. Reconnaissance cytosolique de la flagelline par les NLRs, Naip5 et Ipaf

A l'instar de tous les NLRs, Ipaf et Naip5 possèdent un domaine LRR, impliqué dans la reconnaissance de la flagelline, ainsi qu'un domaine central NOD. Ils se distinguent néanmoins par leur domaine effecteur amino-terminal. En effet, Ipaf possède un domaine

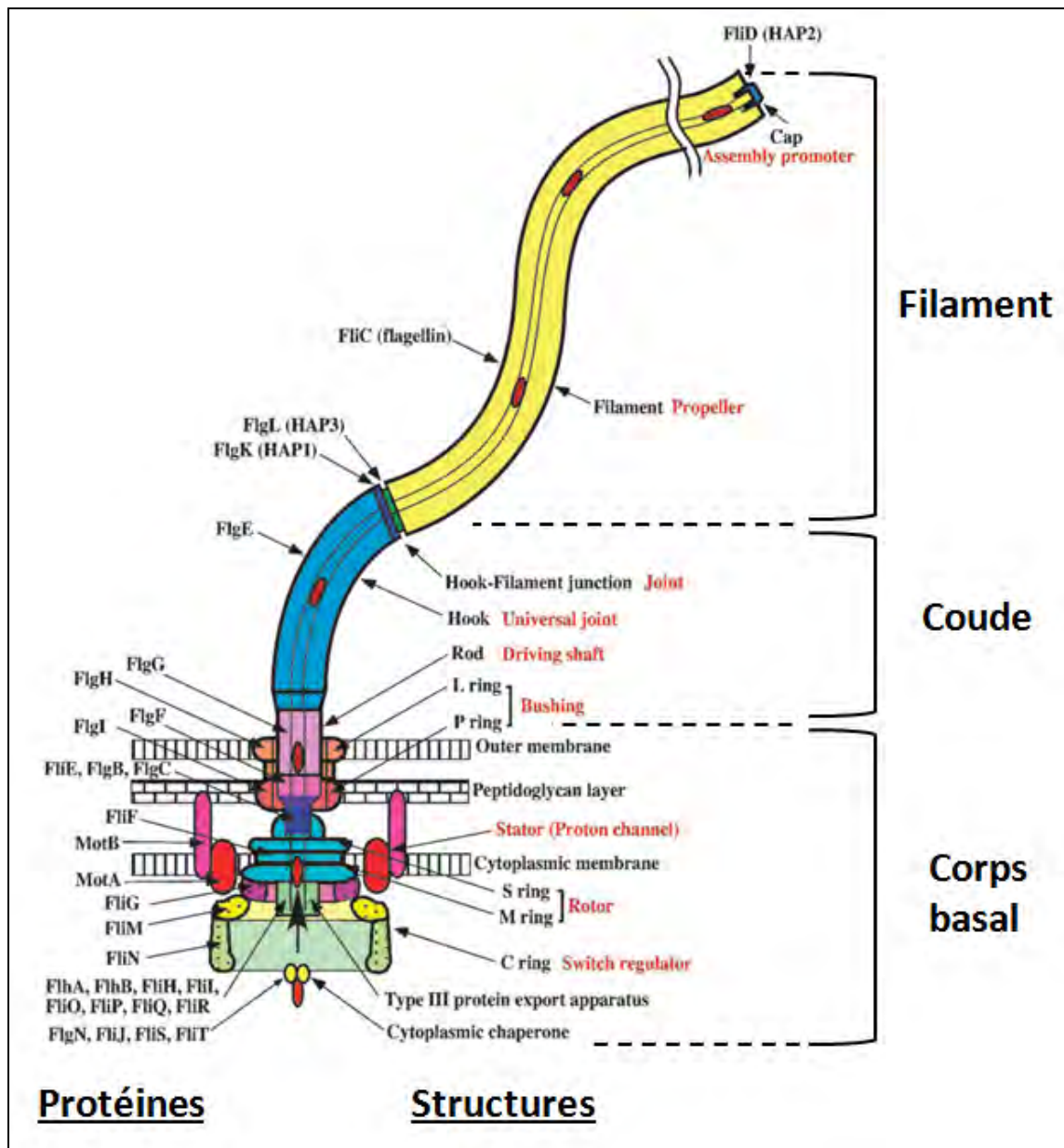


Figure 7. Illustration de la structure du flagelle de la bactérie Gram-négative *Salmonella typhimurium* (adapté de Minamino, 2008). Le flagelle se compose de trois parties majeures distinctes. Du bas vers le haut, on retrouve le corps basal, le coude et le filament. Le corps basal, jouant le rôle de moteur flagellaire, est intégré au sein de l'enveloppe bactérienne tandis que le coude et le filament se projettent vers l'extérieur de la bactérie. Le moteur du flagelle est composé d'un stator au sein duquel tourne un rotor, grâce à une force ion-motrice (proton ou sodium). Cette machine moléculaire peut tourner aussi bien dans le sens horloger que dans le sens anti-horloger. Lorsque le moteur fonctionne dans le sens anti-horloger, la bactérie se déplace de manière rectiligne ('swimming'). À l'inverse, la réversion du sens de rotation de ce dernier permet au microorganisme de changer brusquement de direction ('tumbling'). La force motrice générée par le moteur moléculaire est transmise au filament propulseur par l'intermédiaire du coude. Chez les bactéries Gram-négatives, la jonction entre le moteur flagellaire et le coude est réalisée par trois anneaux multiprotéiques imbriqués au sein des parois interne (MS-ring) et externe (L-ring) de la bactérie ainsi qu'au niveau du peptidoglycane (P-ring).

CARD (Caspase Recruitment Domain) tandis que Naip5 possède un domaine BIR (Baculovirus IAP Repeats) (Yu and Finlay 2008) (**Fig. 11**). Ces NLRs sont exprimés dans le cerveau, dans les macrophages et dans les tissus riches en macrophages comme le foie, le poumon ou la rate (Diez, Yaraghi et al. 2000; Poyet, Srinivasula et al. 2001).

3.1. Base structurale de la reconnaissance de la flagelline par Ipaf et Naip5

Contrairement au TLR5 (Smith, Andersen-Nissen et al. 2003), aucune interaction physique directe n'a pu être mise en évidence jusqu'à présent entre la flagelline et ses deux PRRs cytoplasmiques, Ipaf et Naip5.

Par ailleurs, il a été démontré que l'inflammasome impliquant Ipaf pouvait également être activé en réponse à une infection causée par *Shigella flexneri*, indépendamment de la production de flagelline (Suzuki, Franchi et al. 2007). Face à ce constat, on a longtemps pensé que la réponse immunitaire intracytoplasmique observée suite à la reconnaissance de la flagelline par Ipaf et Naip5 devait faire intervenir d'autres acteurs comme des toxines (cfr. formation de pores membranaires) ou des composants des systèmes de sécrétions responsables de sa translocation dans le cytosol de la cellule hôte (Sutterwala, Ogura et al. 2007).

Néanmoins, une étude menée par Lightfield et al. a montré qu'une portion du domaine carboxy-terminal conservé (D0) de la flagelline est requise pour l'activation de Ipaf et Naip5 (Lightfield, Persson et al. 2008).

À l'instar du consensus reconnu par le TLR5, la région carboxy-terminal de la flagelline impliquée dans l'activation de Naip5 et Ipaf est très conservée parmi différentes espèces bactériennes et est essentielle pour la polymérisation et la mobilité du filament (Lightfield, Persson et al. 2008).

Récemment, Miao et al. ont démontré que le NLR Ipaf peut être activé par la flagelline ainsi que par PrgJ, le monomère de l'anneau périsplasmique de l'appareil de sécrétion de type III de *Salmonella typhimurium* (SPI1-T3SS). Afin de déterminer la séquence nécessaire pour l'activation de ce NLR, des versions tronquées de ces deux protéines ont été générées. Les résultats ont montré que les 7 derniers résidus de la région carboxy-terminal de ces protéines sont impliqués dans l'activation de l'inflammasome 'Ipaf' (Miao, Mao et al. 2010). Cette observation renforce l'hypothèse de Suzuki et al. selon laquelle Ipaf serait capable de reconnaître d'autres protéines que la flagelline.

Quoiqu'il en soit, aucune observation ne permet à l'heure actuelle de déterminer si Naip5 et/ou Ipaf sont les senseurs 'primaires' de la flagelline cytosolique. Néanmoins, il a été démontré que ces deux protéines co-précipitaient (Zamboni, Kobayashi et al. 2006), ce qui suggère que celles-ci pourraient fonctionner de concert au sein d'un complexe.

3.2. Voies de signalisation de Naip5 et Ipaf

En absence de leurs ligands, il semblerait que tous les NLRs soient présents au sein du cytosol dans un état inactif. Leur domaine LRR serait ainsi directement replié sur le domaine NOD, empêchant l'oligomérisation de celui-ci avec d'autres NLRs (Miao, Andersen-Nissen et al. 2007). Suite à la reconnaissance de la flagelline par son LRR, Ipaf subit un changement conformationnel libérant son domaine NOD. Ceci permet alors à Ipaf d'oligomériser et de recruter la pro-caspase 1 grâce à leur domaine CARD, formant ainsi un complexe

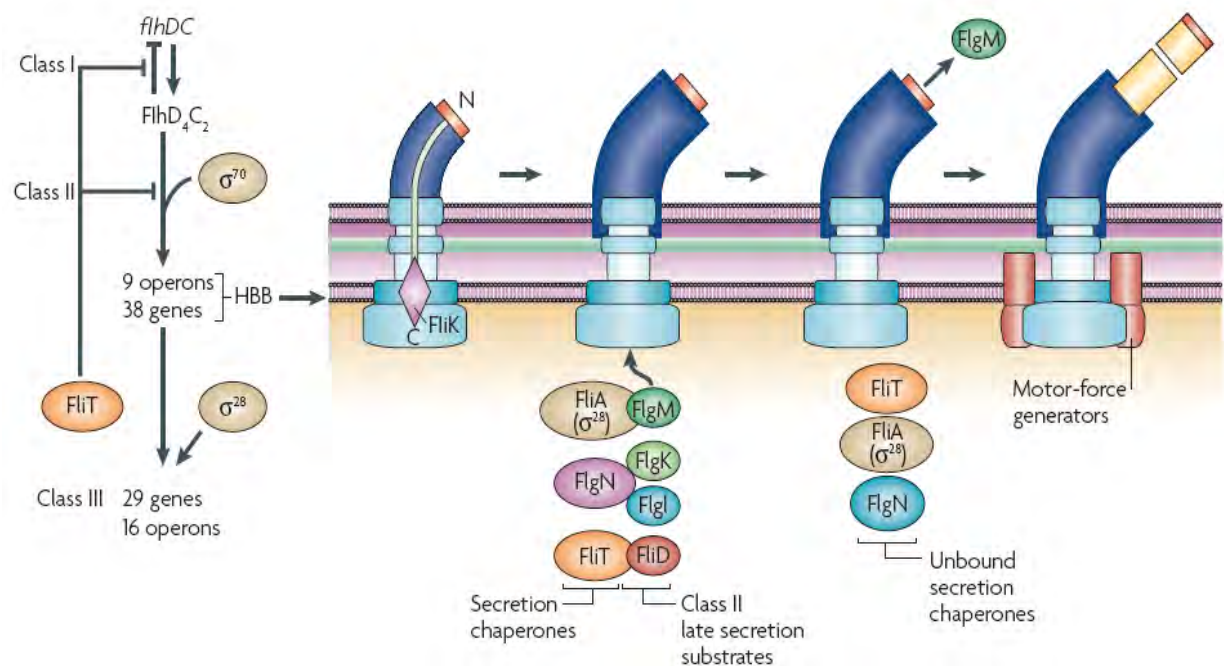


Figure 8. L'assemblage du flagelle bactérien est un processus finement régulé (d'après Chevance et al., 2008). Ce schéma illustre la régulation de l'assemblage du flagelle décrite pour *Salmonella typhimurium*. L'opéron *flhDC*, également surnommé opéron 'régulateur maître' (classe I), est sous le contrôle de divers signaux médiateurs capables d'induire ou de réprimer l'expression des gènes flagellaires. Les protéines de classe I, FlhC et FlhD, forment un complexe hétéromultimérique FlhD₄C₂ qui, grâce à l'intervention du facteur sigma 70, induit la transcription des gènes flagellaires de classe II et réprime leur propre expression. Les gènes de classe II regroupent les gènes d'assemblage et de structure du corps basal ainsi que du coude. Après l'assemblage du complexe HBB (Hook- Basal Body), diverses protéines flagellaires vont être sécrétées avec leur chaperone respective, notamment FliT et FliA. FliT est un régulateur capable d'empêcher l'auto-inhibition du complexe FlhD₄C₂ ainsi que l'activation des promoteurs de classe II. La protéine FliA, correspondant au facteur de transcription sigma 28, induit les gènes flagellaires de classe III, codant notamment pour la protéine du filament ainsi que pour les éléments du système de chimotactisme.

macromoléculaire dénommé ‘inflammasome’ (**Fig. 11**) (Roy and Zamboni 2006; Delbridge and O’Riordan 2007). Ce complexe multiprotéique permet d’activer la caspase-1, une protéase inflammatoire impliquée dans la maturation des pro-IL-1 β et pro-IL-18 en IL-1 β et IL-18, pouvant être sécrétée (**Fig. 12**). L’IL-1 β est capable de générer une réponse inflammatoire locale et systémique contre l’infection, notamment en induisant de la fièvre ainsi qu’en recrutant et en activant divers leucocytes. L’IL-18, quant à elle, est un facteur capable d’induire la production d’interféron- γ par les cellules Natural Killer ainsi que les lymphocytes T, polarisant ainsi une réponse immunitaire de type Th1, efficace contre des pathogènes intracellulaires (Lamkanfi and Dixit 2009). Par ailleurs, une fois activées, de concert avec d’autres fonctions remplies par la caspase-1¹, ces deux cytokines pro-inflammatoires participent à l’activation d’une forme de mort cellulaire nommée pyroptose (**Fig. 13**). Celle-ci se distingue d’un point de vue mécanistique et morphologique des formes classiques de mort cellulaire. En effet, la pyroptose dépend intégralement de la caspase-1 et ne fait pas intervenir les caspases 3, 6 et 8, impliquées dans l’apoptose. Les substrats clivés par les caspases apoptotiques ne subissent pas de protéolyse au cours de la pyroptose. Comme pour la mort cellulaire par nécrose, la pyroptose se caractérise par la rupture rapide de la membrane plasmique suite à la formation de pores et par la libération massive d’un contenu intracellulaire pro-inflammatoire dans le milieu extracellulaire. De plus, de manière dépendante de la caspase-1, elle active le clivage de l’ADN chromosomique, la destruction du cytosquelette d’actine ainsi que l’inactivation d’enzymes métaboliques (Bergsbaken, Fink et al. 2009; Martinon, Mayor et al. 2009).

3.3. Contribution de Naip5 et Ipaf au cours de l’infection

Plusieurs études, réalisées aussi bien *ex vivo* que *in vivo*, ont permis de mettre en évidence le rôle important de Ipaf dans le contrôle d’infections causées par des bactéries pathogènes flagellées.

Il a en effet été montré que des macrophages infectés par diverses souches de bactéries Gram-négatives, comme *Salmonella typhimurium* (Franchi, Amer et al. 2006), *Pseudomonas aeruginosa* (Sutterwala, Mijares et al. 2007) et *Legionella pneumophila* (Amer 2010) étaient capables d’activer la caspase-1 via Ipaf.

Pour chacune des souches testées, la maturation de la caspase-1 en aval de l’activation de Ipaf, après reconnaissance de son ligand, permet aux macrophages de restreindre la réplication de ces pathogènes intracellulaires, en enclenchant la libération massive des interleukines IL-1 β et IL-18. En plus de Ipaf, l’activation de la caspase-1, dans ces contextes infectieux, est également dépendante des systèmes de sécrétion de type 3 (*Salmonella* et *Pseudomonas*) et de type 4 (*Legionella*).

Par ailleurs, l’administration de flagelline de *Salmonella* purifiée dans des macrophages, par l’intermédiaire de protéines capables de former des pores membranaires ou de liposomes, est capable d’activer à elle seule l’inflammasome ‘Ipaf’ et de contrôler la réplication du pathogène (Sun, Rolan et al. 2007).

¹ La caspase-1 est capable de cliver au moins 41 protéines. Parmi celles-ci, on retrouve des protéines chaperones, des protéines du cytosquelette, des protéines de la machinerie de traduction ainsi que des protéines de la glycolyse (Shao, Yeretssian et al. 2007). La caspase-1 est également impliquée dans la maturation d’autres interleukines comme l’IL-33, une cytokine associée à une réponse immunitaire de type Th2 (Schmitz, Owyang et al. 2005).

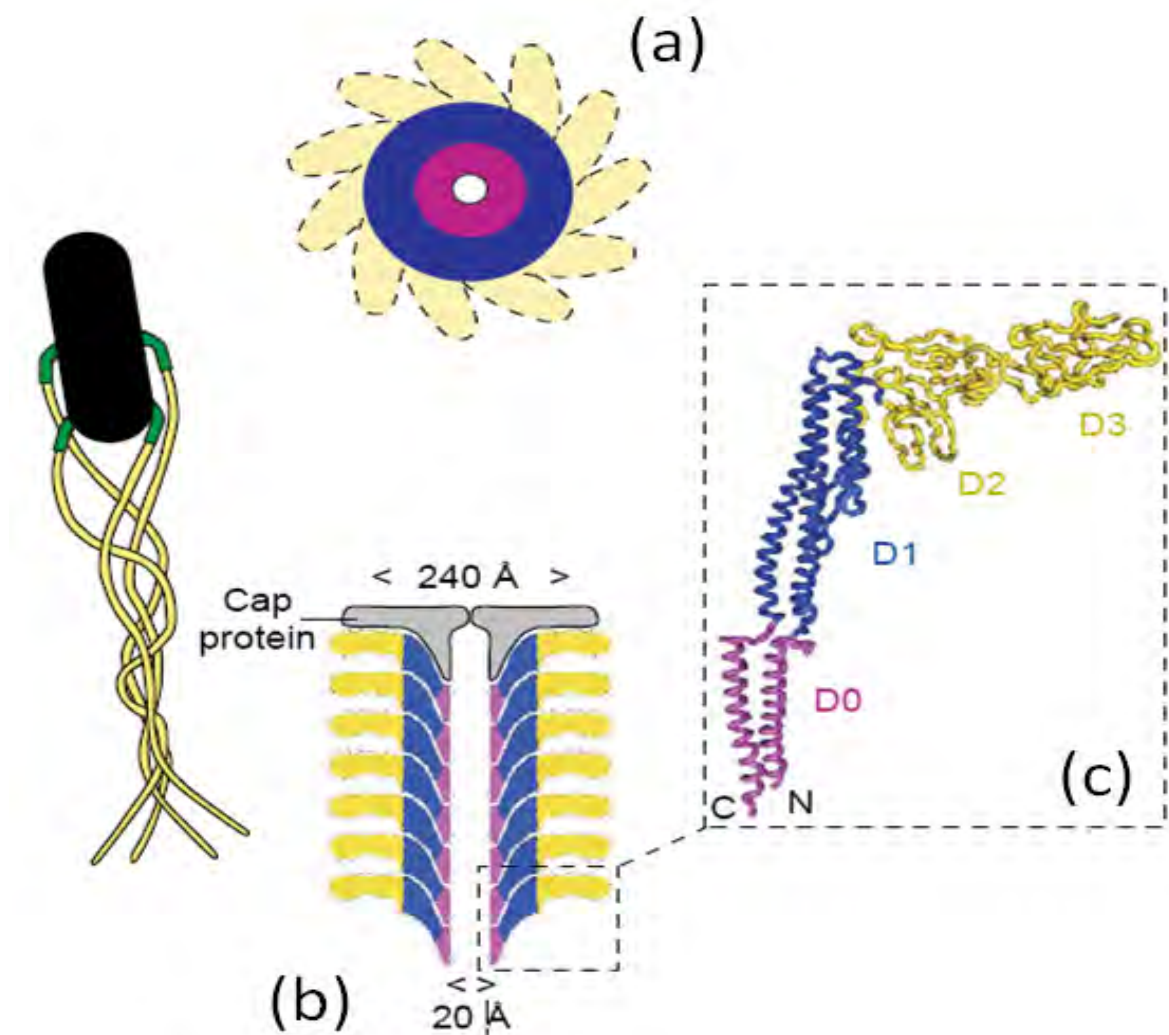


Figure 9. La flagelline est le monomère du filament du flagelle (d'après Ramos, 2004). Ce schéma illustre, par l'intermédiaire de coupes transversales (a) et longitudinales (b), l'agencement de la flagelline au sein du filament du flagelle de *Salmonella typhimurium*. À droite (c), on retrouve un diagramme en ruban mettant en évidence les différents domaines structuraux de la flagelline. Celle-ci se compose d'un domaine terminal (D0, en mauve) et d'un domaine central (D1, en bleu), tous deux constitués d'hélices- α . La flagelline de *Salmonella typhimurium* contient également deux domaines globulaires hypervariables (D2 et D3, en jaune), résultant quant à eux d'un agencement de feuillets- β . La coupe transversale (a), représentant plusieurs cercles concentriques, montre l'organisation des différents domaines de la flagelline au sein du flagelle. Les deux domaines constitués d'hélices- α (D0 et D1), jouant un rôle prépondérant dans l'assemblage et la mobilité du flagelle, sont imbriqués au centre de la structure. Les domaines globulaires (D2 et D3) sont projetés vers l'extérieur du filament. Chez les entérobactéries, la coiffe du filament est composée de 5 protéines FlhD (cap protein) (c). Son rôle est d'agencer de manière ordonnée les monomères de flagelline lors de la synthèse du filament.

De plus, l'utilisation de souris n'exprimant pas Ipaf montre que celles-ci sont plus susceptibles à des infections causées par *Legionella pneumophila* (Amer 2010) et *Pseudomonas aeruginosa* (Sutterwala, Mijares et al. 2007).

Bien que l'implication de Ipaf dans le contrôle de l'infection causée par *Salmonella typhimurium* ait été démontré lors de modèles d'infection *ex vivo*, des souris Ipaf^{-/-} infectées ne sont pas plus susceptibles à celui-ci. Cependant, des souris caspase-1^{-/-} sont quant à elles plus susceptibles à l'infection causée par *Salmonella* (Lara-Tejero, Sutterwala et al. 2006). Cette différence observée en modèle d'infection murin suggère que d'autres voies, indépendantes de Ipaf, sont capables d'activer la caspase-1 lors de la réponse immune contre ce pathogène.

Le rôle de Naip5 au cours d'un processus infectieux est moins clair que pour Ipaf. Il a néanmoins été montré que des macrophages issus de souris A/J, porteur d'un allèle défectueux de Naip5, étaient permissifs à la réplication intracellulaire de *Legionella pneumophila* ; ce qui n'est pas le cas des macrophages issus de souris C57BL/6J *wild-type* (Wright, Goodart et al. 2003). Cependant, il a également été mis en évidence que ces mêmes macrophages étaient toujours capables d'activer la caspase-1 en réponse à *Legionella pneumophila*, vraisemblablement par l'intermédiaire de Ipaf (Ren, Zamboni et al. 2006). Le domaine effecteur de Naip5 étant composé de 3 fragments BIR (Baculovirus-Inhibitor-of-apoptosis Repeats) capables de lier et d'inhiber les caspases apoptotiques 3, 7 et 9, plusieurs groupes de recherches ont proposé que le rôle joué par Naip5 dans la réponse contre *Legionella pneumophila* ne devait pas être lié à l'activation d'un inflammasome. Ce dernier serait davantage impliqué dans l'inhibition de la maturation de la vacuole contenant *Legionella* et donc dans la modulation du devenir intracellulaire de ce pathogène (Lamkanfi, Amer et al. 2007).

4. Flagelline atypique et échappement

Face aux différents PRRs de l'immunité innée destinés à reconnaître la flagelline, certains pathogènes ont élaboré diverses parades pour éviter ou moduler l'action de ceux-ci.

Par exemple, en dépit du fait que le TLR5 reconnaisse un segment du domaine D1 hautement conservé et essentiel à la fonction de la flagelline (Smith, Andersen-Nissen et al. 2003), celle de certaines bactéries, parmi lesquelles *Helicobacter pylori* et *Campylobacter jejuni*, montrent des variations dans cette séquence qui empêchent sa détection (**Fig. 14**). La mobilité de ces microorganismes étant essentielle à la colonisation et à la persistance au sein de leur hôte (Kavermann, Burns et al. 2003), leur flagelline présente également une série de mutations compensatoires destinées à assurer la polymérisation du filament ainsi que sa mobilité (Andersen-Nissen, Smith et al. 2005).

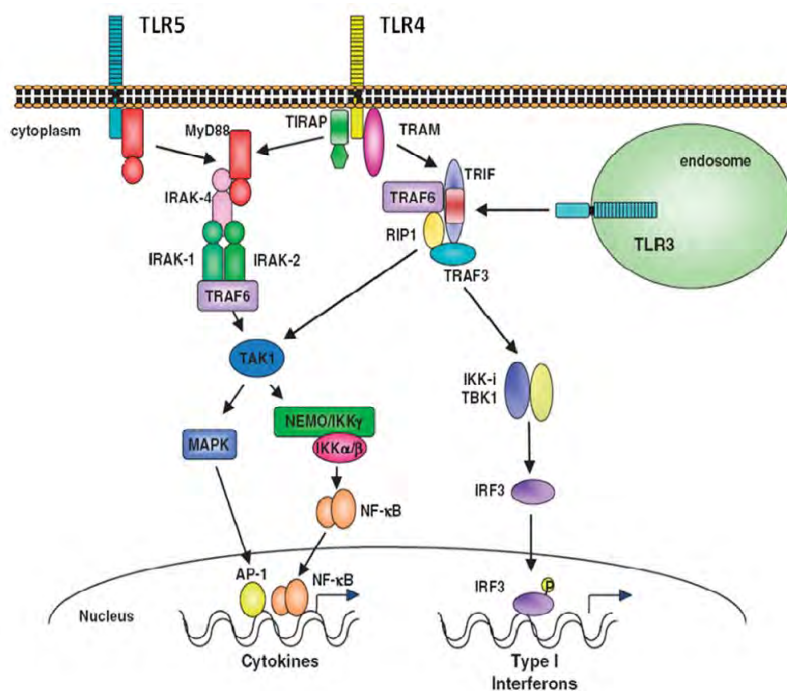


Figure 10. Voies de signalisation initiées par les TLRs (adapté de Akira, 2009). Ce schéma représente les deux voies de signalisation pouvant être initiées suite à la reconnaissance d'un PAMP par un TLR. On parle de voie 'MyD88-dépendante' (à gauche) et 'MyD88-indépendante' ou 'TRIF-dépendante' (à droite). La détection de la flagelline par le TLR5 déclenche une voie de signalisation 'MyD88-dépendante' donnant lieu, suite à l'activation des facteurs de transcription AP-1 et NF-κB, à la production de cytokines pro-inflammatoires.

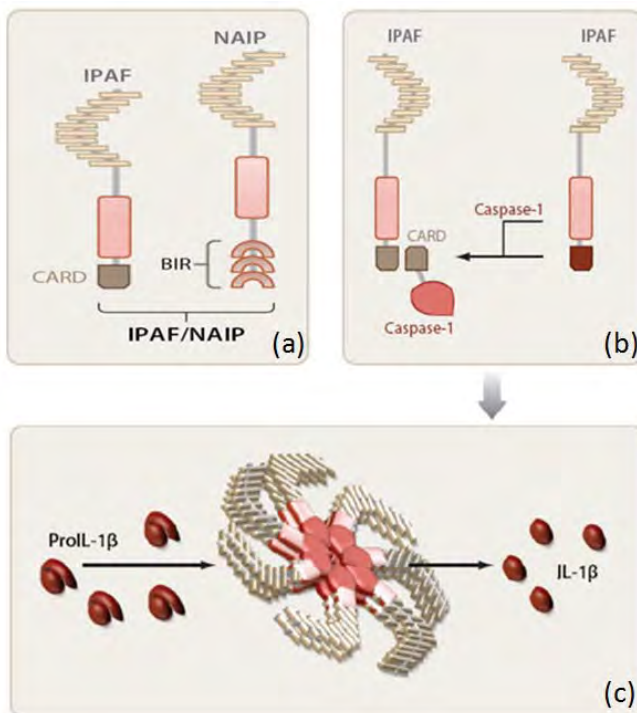


Figure 11. Les NLRs IPAF et NAIP-5 permettent de reconnaître la flagelline cytosolique (adapté de Martinon et al., 2009). L'image (a) illustre les deux NLRs capables de détecter la flagelline au sein du cytosol. Ceux-ci, appartenant tous deux à la sous-famille IPAF des NLRs, se distinguent de par leur domaine effecteur. IPAF et NAIP-5 arborent respectivement un domaine CARD (caspase-recruitment domain) et BIR (baculovirus IAP repeats). Après reconnaissance de la flagelline cytosolique au niveau de son LRR (leucine-rich repeat), IPAF recrute la pro-caspases-1, grâce à leur domaine CARD respectif, et permet d'activer la caspase-1 (b). Ces deux acteurs donnent lieu à la formation d'un complexe macromoléculaire dénommé inflammasome (c). L'activation de celui-ci assure la maturation de cytokines pro-inflammatoires, comme la pro-IL-1β, ainsi

qu'une forme de mort cellulaire, la pyroptose. Grâce à ces deux mécanismes effecteurs, inflammation et mort cellulaire, les NLRs permettent de limiter la croissance des pathogènes intracellulaires.

C. *Brucella* : De la furtivité à la chronicité

1. *Le genre Brucella, espèces et pathologie*

Les bactéries du genre *Brucella* sont les agents infectieux responsables de la brucellose, la zoonose la plus répandue dans le monde (Boschioli, Foulongne et al. 2001; Pappas, Panagopoulou et al. 2006). Ce sont des coccobacilles Gram-négatifs, pathogènes intracellulaires facultatifs (Guerra 2007). Elles appartiennent à la subdivision α -2 des protéobactéries, sous-classe reprenant de nombreuses espèces vivant en étroite association avec des organismes eucaryotes. On y retrouve notamment les rhizobia, des symbiotes de plantes fixateurs d'azote ; *Agrobacterium*, un pathogène extracellulaire de plantes capable de transformer celles-ci en intégrant un 'T-DNA' dans leur génome ; *Wolbachia*, un symbiote intracellulaire d'insectes ; *Bartonella*, un pathogène intracellulaire facultatif de mammifères ou *Rickettsia*, un pathogène intracellulaire capables d'infecter l'homme ainsi que des insectes (Batut, Andersson et al. 2004).

Actuellement, le genre *Brucella* regroupe dix espèces, classées principalement suivant leur hôte préférentiel mais également sur base de caractéristiques biochimiques (besoins en CO₂, production de H₂S,...) (Moreno and Moriyon 2002; Scholz, Hubalek et al. 2008) : *B. melitensis* (mouton et chèvre), *B. abortus* (bovins), *B. suis* (porc), *B. ovis* (mouton), *B. canis* (chien), *B. neotomae* (rat du désert), *B. pinnipedialis* (pinnipèdes), *B. ceti* (cétacés), *B. microti* (campagnol des champs) et *B. inopinata* (hôte non déterminé). De plus, en provoquant l'avortement et la stérilité des mâles au sein du bétail, la brucellose est décrite comme la zoonose ayant l'impact économique le plus dévastateur dans le monde (Gorvel 2008).

Même si les différents hôtes cités ci-dessus représentent leurs cibles préférentiels, *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* et rarement *B. canis* sont capables d'infecter l'homme, donnant lieu à une maladie débilitante communément connue sous le nom de 'fièvre de Malte' (Gamazo, Lecaroz et al. 2006). L'infection humaine en phase aiguë présente une symptomatique clinique variable mais est généralement associée à de la fatigue, des malaises, des fièvres ondulantes ou encore des sueurs nocturnes. En fonction des organes touchés par l'infection, des complications diverses peuvent survenir en cas de non-diagnostic ou de non-traitement, comme des maladies ostéoarticulaires, des endocardites ainsi que des troubles pulmonaires ou urogénitaux (Pappas, Akritidis et al. 2005). Même si aucun vaccin n'existe actuellement pour traiter les infections humaines, les personnes atteintes par la fièvre de Malte peuvent être soignées par un traitement combinant doxycycline et rifampicine (ou streptomycine) (Pappas, Panagopoulou et al. 2006).

Même s'il s'avère que la nature ainsi que la sévérité de la maladie occasionnée puisse apparaître particulièrement variable, une caractéristique commune de l'infection causée par *Brucella*, chez l'hôte naturel comme chez l'humain, est sa propension à atteindre un statut chronique (Jimenez de Bagues, Dudal et al. 2005).

2. *Brucella : un stratège furtif*

En considérant que *Brucella*, à l'instar des autres symbiotes et pathogènes retrouvés chez les α -protéobactéries, ait coévolué au contact de son hôte eucaryote, il est logique

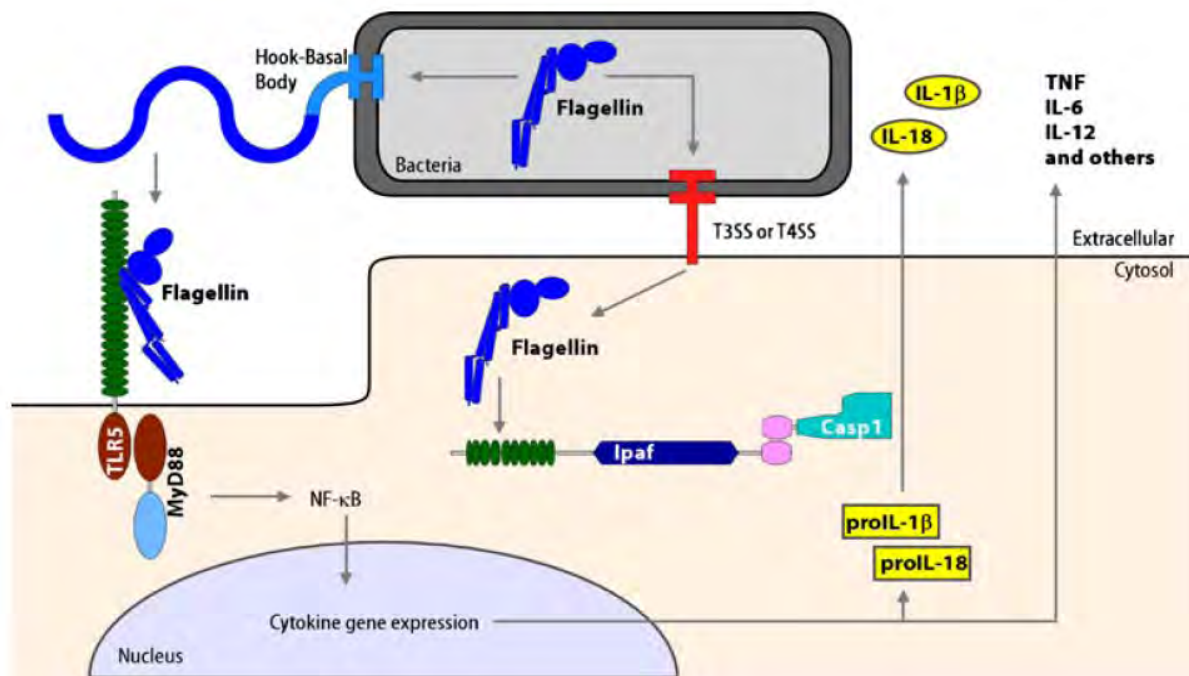


Figure 12. La reconnaissance concertée de la flagelline extra- et intracellulaire initie deux voies de signalisation immunitaires complémentaires (d'après Miao et al., 2007). Cette figure illustre le caractère synergique lié à l'activation des TLRs et des NLRs. Cet exemple se focalise sur la reconnaissance de la flagelline cependant le TLR5 peut être substitué par n'importe quel TLR activant la voie 'MyD88-dépendante' tandis que Ipaf peut être remplacé par n'importe quel NLR capable d'activer la caspase-1. Dans ce cas-ci, le TLR5 détecte des monomères de flagelline extracellulaires et permet d'induire, grâce à MyD88 et NF-κB, l'expression de cytokines pro-inflammatoires. Ipaf, quant à lui, reconnaît la flagelline cytosolique et active la caspase-1. L'IL-1β et l'IL-18 sont deux cytokines nécessitant un double stimulus pour permettre leur sécrétion. Dans ce cas-ci, l'activation du TLR5 fournit le premier signal et stimule la production des précurseurs immatures pro-IL-1β et pro-IL-18, qui restent confinés dans le cytosol. En parallèle, la perception de la flagelline cytosolique par Ipaf apporte le second stimulus et permet de cliver et d'activer, grâce à la caspase-1, les formes immatures de ces interleukines. Ce 'cross-talk' TLR-NLR démontre la capacité de l'immunité innée à déterminer la nature de l'agent responsable d'une infection afin de déclencher les moyens de défenses les plus appropriés contre celui-ci.

d'imaginer que celle-ci ait développé une certaine aptitude à manipuler les processus cellulaires de ce dernier.

Cependant, diverses études ont démontré que *Brucella* était dépourvue de facteurs de virulence 'classiques' rencontrés chez la plupart des bactéries pathogènes. En effet, elle ne présente pas de capsule, d'exotoxines, de plasmides, de phages lysogéniques, de gènes de résistance ou encore de fimbries (Moreno and Moriyon 2002; Seleem, Boyle et al. 2008).

Néanmoins, il apparaît que *Brucella* a mis au point de multiples mécanismes afin d'assurer le développement d'infections de longue durée chez son hôte. La nature chronique de l'infection causée par ce pathogène dépend de deux caractéristiques : sa capacité à persister au sein des phagocytes professionnels et non-professionnels et son aptitude à éviter l'activation du système immunitaire inné au début de l'infection (Roop, Bellaire et al. 2004).

2.1. Persistance au sein des phagocytes professionnels et non-professionnels

Comme l'ont proposé Moreno et Moriyon, un terme plus approprié pour définir *Brucella* serait de la qualifier de « parasite intracellulaire facultativement extracellulaire » (Moreno and Moriyon 2002). De fait, bien que pouvant être cultivés sur milieu en laboratoire, les *Brucellae* ne peuvent survivre pendant une période prolongée en dehors de leur hôte. Leur aptitude à causer des infections dépend de leur capacité à persister et à se répliquer au sein de leurs cellules hôtes, les phagocytes professionnels et non-professionnels.

Des données collectées *in vivo* ont démontré que *Brucella* est capable d'infecter les cellules dendritiques (Salcedo, Marchesini et al. 2008) (R. Copin, thèse en cours), les polymorphonucléaires neutrophiles (Ackermann, Cheville et al. 1988; Salcedo, Marchesini et al. 2008) ainsi que les cellules M (Ackermann, Cheville et al. 1988). De plus, les *Brucellae* peuvent également persister et se répliquer au sein des macrophages (Cheers and Pagram 1979) et de trophoblastes (Anderson, Cheville et al. 1986).

2.2. Manipulation du trafic intracellulaire pour l'atteinte de sa niche de réplication

Les études menées *ex vivo* ont démontré que la capacité impressionnante de *Brucella* à se répliquer dans ses diverses cellules hôtes était directement liée à son habilité à détourner le trafic intracellulaire classique d'endocytose, afin d'éviter sa dégradation dans un phagolysosome (Roop, Bellaire et al. 2004). Cette stratégie s'avère essentielle à sa survie, car elle lui permet d'atteindre sa niche de réplication. Celle-ci est un compartiment dérivé du réticulum endoplasmique et est dénommée « brucellosome » ou BCV (*Brucella* Containing Vacuole) (Kohler, Michaux-Charachon et al. 2003; Roop, Bellaire et al. 2004; Starr, Ng et al. 2008). *Brucella* dispose d'un panel d'acteurs moléculaires originaux dont l'intervention ordonnée, dans l'espace et dans le temps, s'avère indispensable pour l'atteinte de cette vacuole de réplication (**Fig. 15**).

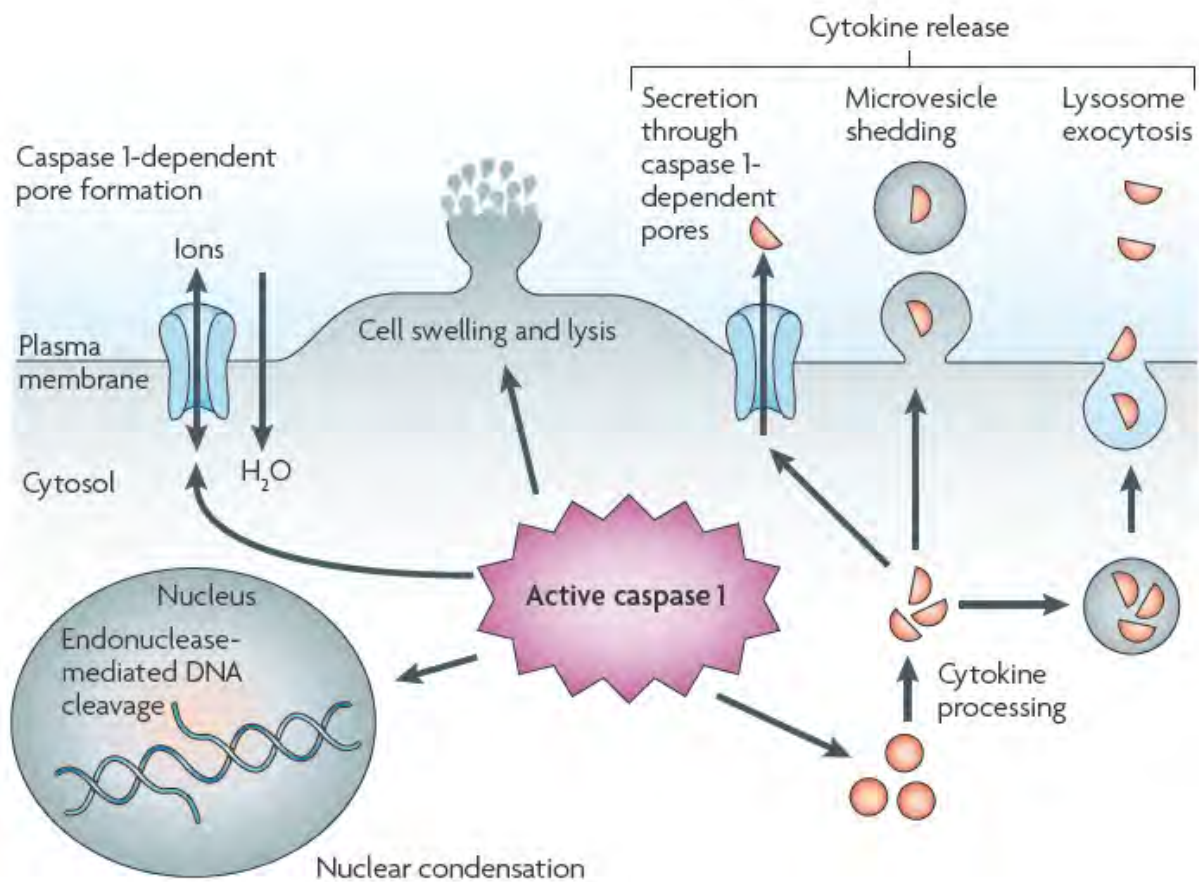


Figure 13. La pyroptose est une forme de mort cellulaire pro-inflammatoire (d'après Bergsbaken et al., 2009). Une fois la caspase-1 activée par l'inflammasome celle-ci donne lieu au développement d'un programme de mort cellulaire spécialisé nommé 'pyroptose'. L'activation de la caspase-1 conduit à la formation rapide de pores dans la membrane plasmique de la cellule. Ceux-ci engendrent la dissipation des gradients ioniques cellulaires, entraînant ensuite un important influx d'eau dans la cellule, son gonflement ainsi que sa lyse osmotique. La caspase-1 participe aussi à la maturation des formes immatures de l'IL-1 β et de l'IL-18. Ces dernières, une fois sous leur forme active, sont libérées dans le milieu extracellulaire. Bien que les mécanismes à la base de leur sécrétion demeurent controversés, il se pourrait qu'elles soient sécrétées par exocytose, par bourgeonnement de microvésicules ou par l'intermédiaire des pores générés au cours de la pyroptose. De plus, l'activation de la caspase-1 est également associée au clivage de l'ADN chromosomique. Bien que l'endonucléase responsable de ce clivage ne soit pas identifiée, celle-ci n'engendre pas la formation des fragments oligonucléosomiaux générés typiquement au cours de l'apoptose.

2.2.1. Importance de son LPS

Pour bon nombre de pathogènes, l'internalisation par un macrophage via la phagocytose représente une mode d'entrée propice à leur destruction. Cependant, diverses études ont démontré que *Brucella* était capable de pénétrer à l'intérieur de la cellule au niveau de microdomaines spécialisés de la membrane plasmique, les lipid rafts (Naroeni and Porte 2002; Lapaque, Moriyon et al. 2005) (**Fig. 16**). Cette voie d'entrée s'avère essentielle pour la survie de *Brucella* dans le macrophage car elle permet de contourner la voie classique de phagocytose, en empêchant la fusion entre le phagosome et le lysosome (Porte, Naroeni et al. 2003). Le LPS lisse de *Brucella*, plus particulièrement la chaîne O, a été identifiée comme étant le facteur clé à la base de l'interaction entre le microorganisme et les lipid rafts. En effet, il apparaît que des mutants rugueux de *Brucella suis*, dépourvus de chaîne O, pénètrent dans le macrophage par une voie indépendante des lipid rafts et fusionnent rapidement avec les lysosomes (Porte, Naroeni et al. 2003). L'internalisation de *Brucella* par les lipid rafts semble faire intervenir d'autres acteurs moléculaires, qui agiraient en synergie avec la chaîne O du LPS. Ainsi, l'internalisation de ce pathogène pourrait également être médiée via l'interaction entre un prion cellulaire (PrPc) et une protéine de choc thermique (Hsp60) (Watarai, Kim et al. 2003) ainsi qu'entre le lipide A de son LPS et le récepteur scavenger de classe A (SR-A) (Kim, Watarai et al. 2004) (**Fig. 16**). Cette hypothèse demeure néanmoins controversée (Fontes, Alvarez-Martinez et al. 2005).

2.2.2. Rôle du système à deux composants BvrS/BvrR

Chez *Brucella*, l'opéron *BvrR/BvrS* code pour un système à deux composants qui joue un rôle important dans l'internalisation de ce pathogène. Le criblage d'une banque de mutants associé à une sensibilité accrue au peptide cationique antimicrobien 'polymyxine B' a montré que ce système à deux composants était impliqué dans la résistance à ce composé (Sola-Landa, Pizarro-Cerda et al. 1998). La fonction principale du couple *BvrR/BvrS* est de contrôler l'expression de gènes impliqués dans la maintenance de l'intégrité de l'enveloppe bactérienne, comme des gènes codant pour des protéines de membrane externe (Omp22 et Omp25) (Guzman-Verri, Manterola et al. 2002) ou des gènes impliqués dans la régulation des patterns d'acylation du lipide A du LPS (Manterola, Moriyon et al. 2005). En plus de présenter une sensibilité accrue aux peptides cationiques antimicrobiens, les souches mutées pour le système *BvrR/BvrS* sont incapables de pénétrer dans leur cellule hôte au niveau des lipid rafts et présentent une atténuation de leur virulence en modèle d'infection de macrophages et de cellules HeLa (Sola-Landa, Pizarro-Cerda et al. 1998; Lopez-Goni, Guzman-Verri et al. 2002).

2.2.3. Implication d'un sucre, le β -1-2 glucane cyclique

Le β -1-2 glucane cyclique, un polymère de glucose périplasmique produit par les α -2 protéobactéries, joue un rôle crucial dans la survie précoce de *Brucella* au sein de son hôte. En effet, il apparaît que des souches mutées pour le gène codant la synthétase (*csg*) sont incapables d'éviter la fusion avec les lysosomes et donc d'atteindre leur niche de réplication. La fonction du β -1-2 glucane cyclique dans la survie intracellulaire de *Brucella* serait liée à la capacité de ce composé à extraire le cholestérol à partir de membranes eucaryotes. Les lipid rafts semblent être des plateformes de signalisation impliquées dans la maturation des

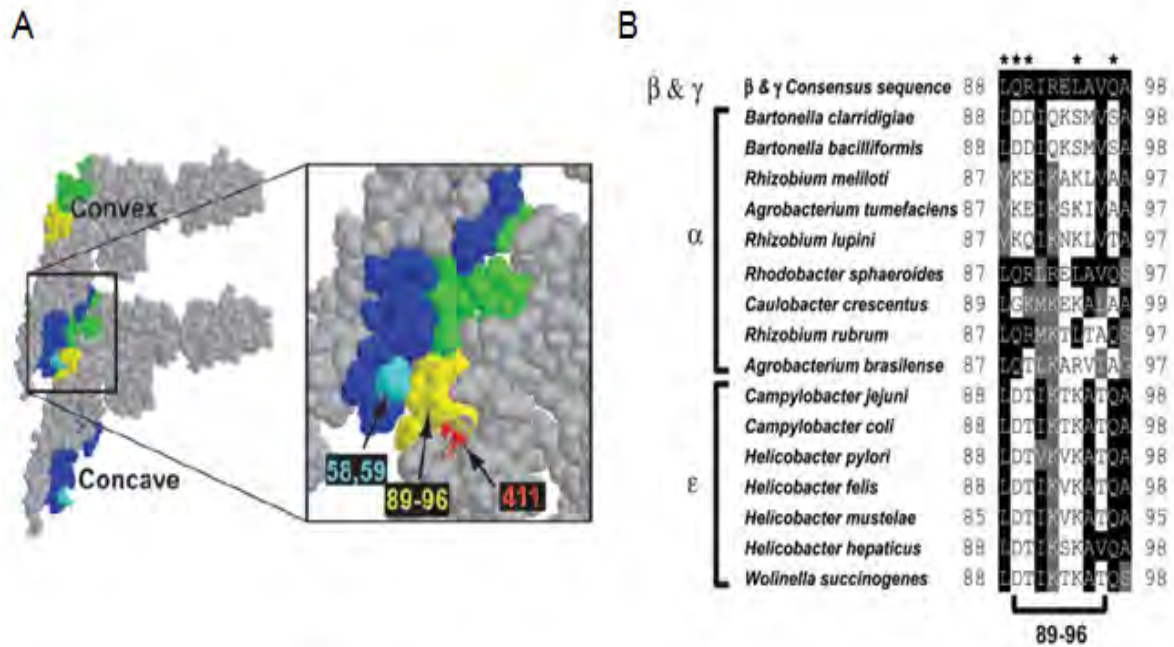


Figure 14. Certaines bactéries flagellées possèdent une flagelline non reconnue par le TLR5 (d'après Andersen-Nissen et al., 2005). (A) Les acides aminés 89 à 96 du domaine D1 sont très conservés chez les β - et les γ -protéobactéries (sous-familles dans lesquelles on retrouve notamment *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* et *Legionella pneumophila*) et activent fortement le TLR5, comme (B) Alignement de séquence de la flagelline de bactéries appartenant à diverses sous-familles de protéobactéries. La séquence du dessus représente le consensus (résidus 88 à 98) chez les β - et les γ -protéobactéries connus pour activer fortement le TLR5. Les astérisques indiquent les résidus importants pour cette activation. Chez *Helicobacter* spp., des ϵ -protéobactéries, il apparaît que ces résidus ne sont pas conservés, ce qui leur permet d'échapper au TLR5.

phagosomes au cours de l'endocytose (Dermine, Duclos et al. 2001). Ainsi, des données suggèrent que le β -1-2 glucane cyclique pourrait être sécrété par *Brucella* afin de disrupter l'intégrité de ces microdomaines signalétiques au sein de la membrane de la BCV, dans le but d'éviter la fusion avec les lysosomes (Briones, Inon de Iannino et al. 2001; Arellano-Reynoso, Lapaque et al. 2005).

2.2.4. Un acteur tardif, l'opéron *virB*

À l'heure actuelle, de nombreuses études ont mis en évidence le rôle déterminant joué par l'opéron *virB*, encodant un système de sécrétion de type IV (T4SS), dans le trafic intracellulaire de *Brucella* (Celli, de Chastellier et al. 2003; Roop, Bellaire et al. 2004). Grâce à l'usage de diverses souches de *Brucella* mutées pour *virB*, on a pu démontrer que ce système de sécrétion n'est pas requis pour les étapes précoces d'internalisation et de trafic intracellulaire, comme c'est le cas pour le LPS ou le β -1-2 glucane cyclique, mais qu'il est directement impliqué dans la maturation tardive de la vacuole abritant *Brucella*, en permettant à celle-ci d'interagir avec le réticulum endoplasmique tout en empêchant sa fusion avec les lysosomes (Delrue, Martinez-Lorenzo et al. 2001; Celli 2006). Les mécanismes moléculaires demeurent néanmoins toujours inconnus à ce jour.

Cependant, de nombreuses bactéries pathogènes, comme *Legionella pneumophila*, *Bordetella pertussis* ou encore *Helicobacter pylori*, utilisent un système de sécrétion afin de transloquer des protéines effectrices dans le cytosol de leur cellule hôte visant à interférer avec les fonctions cellulaires de celle-ci (Cascales and Christie 2003). Il est dès lors probable que le T4SS soit également utilisé de cette manière par *Brucella* afin de diriger les dernières étapes de son trafic au sein de la cellule hôte (Celli, de Chastellier et al. 2003). De plus, des protéines hypothétiques transloquées par le système de sécrétion de type IV de *Brucella* pourraient remplir d'autres fonctions. Celles-ci pourraient en effet être transloquées dans le cytoplasme de leur cellule hôte afin de moduler les processus apoptotiques ainsi que la réponse immunitaire de celle-ci (Gross, Terraza et al. 2000; Pei, Wu et al. 2008; Zhong, Wang et al. 2009). Jusqu'à présent, seules deux protéines putatives présentant une sécrétion dépendante du système de sécrétion de type IV ont été identifiées chez *Brucella*, VceA et VceC, mais leur fonction biologique demeure inconnue (de Jong, Sun et al. 2008).

2.3. Un don inné pour tempérer l'activation de la réponse immunitaire de l'hôte

La majorité des bactéries pathogènes utilisent un large éventail de facteurs de virulence (toxines, adhésines, enzymes, etc.) leur permettant de franchir les barrières protectrices de l'hôte et d'atteindre leur niche de réplication. Cependant, la plupart du temps, ces mécanismes d'agression sont rapidement perçus par les défenses innées de l'immunité et engendrent l'élimination précoce du pathogène. Néanmoins, il apparaît que les pathogènes capables d'engendrer une infection chronique, comme *Brucella*, ont développé divers subterfuges afin d'échapper ou de moduler leur détection par les acteurs du système immunitaire inné. On peut citer par exemple la production de PAMPs atypiques ou encore l'utilisation de protéines effectrices capables d'interférer avec les voies de signalisation en aval de la détection innée par les PRRs.

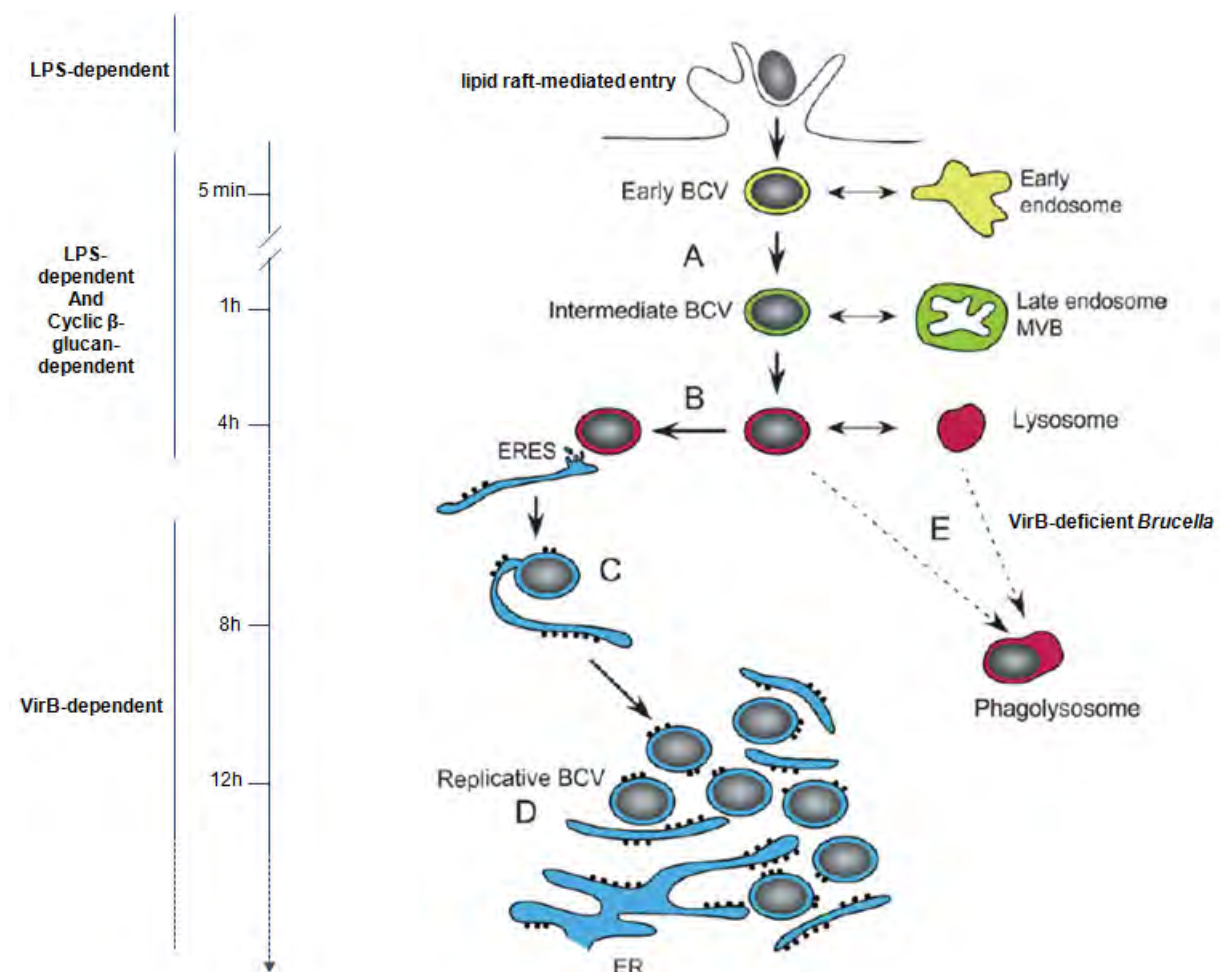


Figure 15. Représentation du trafic intracellulaire de *Brucella* au sein du macrophage : (adapté de Starr et al. 2008 ; Celli et al., 2006). Suite à son entrée dans la cellule au niveau des lipid rafts, le trafic intracellulaire particulier de *Brucella* la conduit vers le réticulum endoplasmique (RE). (A) Directement après avoir été internalisée selon un mécanisme dépendant de son LPS, la vacuole contenant *Brucella* (BCV ; *Brucella* Containing Vacuole) interagit successivement avec les endosomes précoces (en jaune), les endosomes tardifs, les corps multi-vésiculaires (en vert) et finalement les lysosomes (en rouge). Il a été démontré que chacune de ces interactions, dépendantes du LPS ainsi que β -1,2-glucane cyclique était nécessaire afin d'assurer à *Brucella* le trafic intracellulaire adéquat pour atteindre sa niche de réplication. (B-C) Après avoir interagit avec les acteurs du système endocytaire, la BCV dite 'intermédiaire' entretient un contact étroit avec le RE, par l'intermédiaire des sites ERES (ER Exit Sites). (D) Cette interaction lui permet *in fine* de générer une BCV dite 'de réplication', propice à sa survie et à sa réplication au sein de la cellule. (E) Chez un mutant *virB*, la BCV ne peut réaliser son processus complet de maturation ; elle finit par fusionner avec les lysosomes pour donner lieu à un phagolysosome, conduisant à sa destruction.

Brucella a la capacité de passer relativement inaperçue au regard de l'immunité innée de son hôte. Cette aptitude s'illustre notamment par l'absence d'activation d'une forte réponse inflammatoire en début d'infection, contrairement à *Salmonella typhimurium* (Barquero-Calvo, Chaves-Olarte et al. 2007). Cette stratégie furtive implique notamment différents composants de la membrane externe de *Brucella* ainsi qu'une protéine potentiellement sécrétée dans le cytosol de la cellule hôte.

2.3.1. Le LPS et les lipoprotéines, des PAMPs non-conventionnels

Bien que sujets à controverse (Oliveira, de Oliveira et al. 2008), les TLR2 et TLR4, PRRs membranaires reconnaissant respectivement des lipoprotéines et le lipopolysaccharide, semblent jouer un rôle dans la réponse immune contre *Brucella* (Copin, De Baetselier et al. 2007).

Cependant, il a été démontré que le LPS et les lipoprotéines de *Brucella abortus* sont de très faibles inducteurs de réponse inflammatoire chez l'hôte, contrairement à d'autres bactéries pathogènes gram-négatives, comme *Salmonella typhimurium* (Barquero-Calvo, Chaves-Olarte et al. 2007). En effet, contrairement à ce que l'on observe chez des souris infectées par *Salmonella typhimurium*, il apparaît que celles infectées par *Brucella abortus* ne développent pas de choc septique. De plus, l'infection par *Brucella* n'engendre pas un recrutement important de polymorphonucléaires neutrophiles au site d'infection et n'est pas associée à une production massive de cytokines pro-inflammatoires (Barquero-Calvo, Chaves-Olarte et al. 2007).

Cette activité pro-inflammatoire réduite, attribuée au LPS ainsi qu'aux lipoprotéines de *Brucella*, a été associée à la composition non-conventionnelle de ces deux constituants de la membrane externe de cette bactérie, qui en font des PAMPs atypiques.

En effet, le lipide A du LPS de *Brucella* présente des caractéristiques biochimiques qui le distingue du lipide A 'classique' que l'on rencontre chez d'autres bactéries gram-négatives, comme *Escherichia coli*, et qui induisent une forte réponse inflammatoire. Le lipide A de *Brucella* présente en effet un squelette en diaminoglucose (au lieu de glucosamine) ainsi que des chaînes acylées plus longues (C18, C19 et C28 plutôt que C12 et C14) (**Fig. 17**). De plus, celles-ci sont reliées au squelette uniquement par des liens amides et ne mettent pas en jeu de lien ester (Lapaque, Moriyon et al. 2005). Par ailleurs, plusieurs données génétiques confortent l'hypothèse selon laquelle le lipide A de *Brucella* serait directement impliqué dans l'aptitude de cette bactérie à éviter l'induction d'une réponse inflammatoire trop importante chez son hôte. En effet, des souches de *Brucella* mutée pour le gène *bacA* ou l'opéron *bvrRS*, tout deux impliqués dans la régulation de la longueur des chaînes acylées du lipide A (Ferguson, Datta et al. 2004; Manterola, Moriyon et al. 2005), provoquent une importante réponse inflammatoire chez les souris infectées et présentent également une atténuation de leur virulence en modèle d'infection murin (Sola-Landa, Pizarro-Cerda et al. 1998; Parent, Goenka et al. 2007).

Les lipoprotéines de *Brucella*, quant à elles, présentent une structure non-canonique de par leur motif d'acylation. Il a en effet été mis en évidence que les chaînes acylées greffées sur le squelette protéique de celles-ci sont plus longues que celles rencontrées chez d'autres bactéries gram-négatives, comme *Salmonella typhimurium* ou *Escherichia coli* (Barquero-Calvo, Chaves-Olarte et al. 2007).

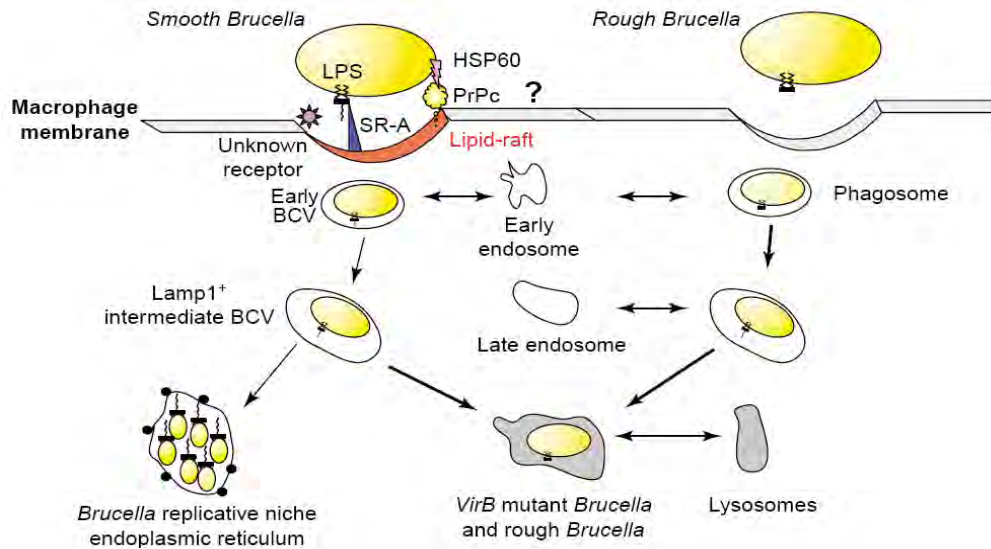


Figure 16. L'internalisation ainsi que le trafic intracellulaire de *Brucella* dépendent de l'interaction de son LPS avec les lipid rafts de la cellule hôte (d'après Lapaque et al., 2005). L'entrée de *Brucella* dans la cellule hôte est médiée par l'interaction de la chaîne O de son LPS avec les lipid rafts ; des acteurs moléculaires supplémentaires seraient également impliqués. En effet, il semble que l'internalisation du pathogène dépende aussi du lipide A de son LPS, via une interaction avec un récepteur scavenger de classe A (SR-A) présent au sein des lipid rafts, ainsi que d'une protéine de choc thermique (HSP60), par une interaction avec un prion cellulaire (PrPc). Après son entrée, *Brucella* échappe rapidement à la voie classique d'endocytose pour finalement atteindre sa niche de réplication, dérivée du réticulum endoplasmique, selon un processus dépendant de *virB*. Par ailleurs, des souches rugueuses, possédant un LPS sans chaîne O, ne peuvent pénétrer dans leur cellule hôte au niveau des lipid rafts ; ils empruntent la voie classique d'endocytose et sont dégradés dans les phagolysosomes.

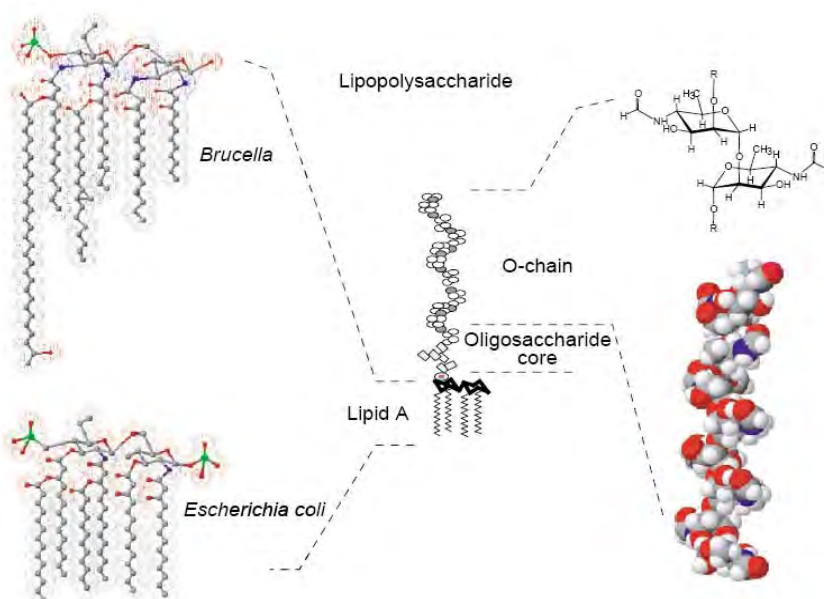


Figure 17. La composition de son lipide A fait du LPS de *Brucella* un PAMP atypique (d'après Lapaque et al., 2005). Le lipide A du LPS de *Brucella* présente une composition différente de celui produit par *Escherichia coli*. En effet, il arbore un squelette de diaminoglucose (au lieu de glucosamine) ainsi que des chaînes acylées plus longues (C18, C19 et C28 au lieu de C12 et C14).

Par ailleurs, d'autres fonctions anti-immunitaires sont également associées au LPS de *Brucella*. Tout d'abord, la chaîne O de celui-ci semble impliquée dans la résistance de ce pathogène face aux protéines du complément (Fernandez-Prada, Nikolich et al. 2001). De plus, il est également doté d'un rôle plus actif d'immunomodulateur car il semble capable d'interférer avec la présentation des antigènes en MHC de classe II. En effet, à l'inverse d'autres antigènes, le LPS de *Brucella* (plus particulièrement sa chaîne O) n'est pas dégradé par les macrophages. Il serait transporté à la surface de la cellule où il formerait des complexes avec les molécules du MHC de classe II. La génération de ces macrodomaines semble interférer avec la capacité des lymphocytes à reconnaître les cellules infectées par *Brucella* et donc parasite en quelque sorte l'établissement de la réponse adaptative (Forestier, Deleuil et al. 2000; Roop, Bellaire et al. 2004).

2.3.2. *Omp25, Omp31 et Btp1*

Une fois infectés par *Brucella*, les macrophages produisent deux cytokines principales comme première ligne de défense, le TNF α et l'interleukine-12 (IL-12) (Gorvel 2008; Oliveira, de Oliveira et al. 2008).

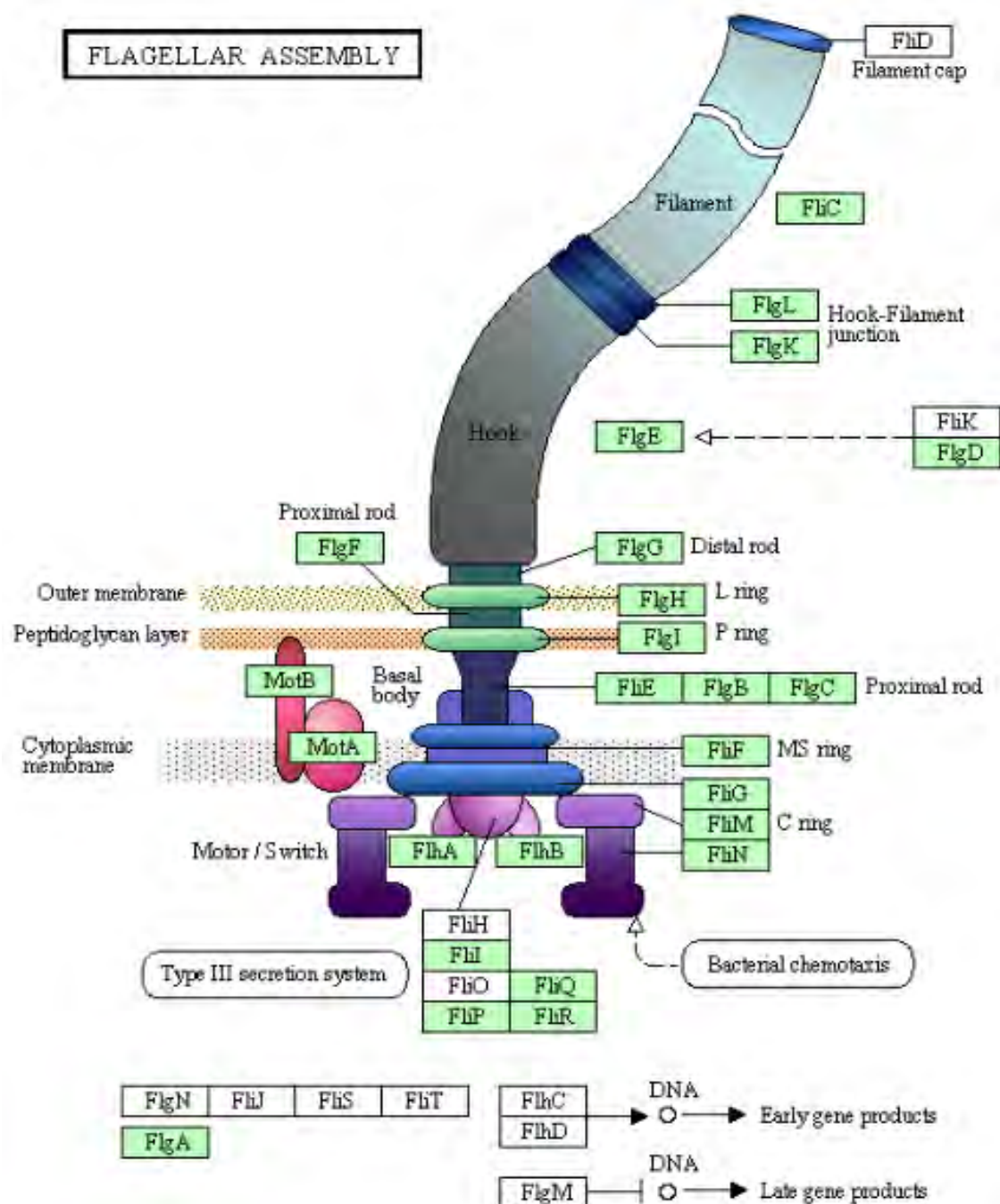
Le TNF α a deux fonctions majeures. Tout d'abord, il exerce une action autocrine sur le macrophage qui le sécrète en stimulant la production d'IL-12 ainsi que ses mécanismes bactéricides, comme la production de dérivés toxiques de l'oxygène et d'oxyde nitrique (NO). Ensuite, de concert avec l'IL-12, il a une action paracrine permettant d'activer les cellules NK pour la production d'interféron- γ (IFN γ), capable à son tour d'augmenter l'activité phagolysosomiale des macrophages. De plus, l'IL-12 intervient également dans l'orientation de la réponse adaptative car elle stimule la différenciation des lymphocytes T en Th1 qui produisent de l'IFN γ (Oliveira, de Oliveira et al. 2008).

Brucella a développé divers mécanismes de défense actifs afin de lutter contre cette triade immunitaire, composée donc du TNF α , de l'IL-12 ainsi que de l'IFN γ .

Un premier mécanisme implique une protéine de la membrane externe de *Brucella*, l'Omp25 (*Outer Membrane Protein 25*). Même si les bases moléculaires de son action demeurent inconnus, il a été démontré que l'Omp25 de *Brucella suis* était impliquée dans l'inhibition de la production de TNF α au cours de l'infection de macrophages humains (Jubier-Maurin, Boigegrain et al. 2001).

Par ailleurs, *Brucella* produit une protéine désignée Btp1 (*Brucella TIR Protein 1*) qui pourrait être sécrétée dans le cytosol de la cellule hôte. Celle-ci possède un domaine TIR homologue au domaine intracellulaire des TLRs. Une souche de *Brucella* mutée pour Btp1 est associée à la maturation des cellules dendritiques, caractérisé par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, comme l'IL-12 et le TNF α par celles-ci. De plus, Btp1 est capable d'interférer directement avec la cascade de signalisation intracellulaire du TLR2 (Salcedo, Marchesini et al. 2008). Une fois dans la cellule, Btp1 mimerait les propriétés de la protéine adaptatrice TIRAP dans la voie de signalisation MyD88-dépendante du TLR2. TIRAP interagit avec le TLR2 et facilite l'assemblage du complexe de signalisation en aval de la reconnaissance du ligand de ce TLR. Comme TIRAP, Btp1 interagit, grâce à son domaine de liaison au phosphatidylinositol, avec la membrane plasmique (Radhakrishnan, Yu et al. 2009).

Récemment, d'autres études ont également suggéré qu'une autre protéine de la membrane externe de *Brucella*, l'Omp31, soit capable d'interférer directement avec les mécanismes de l'immunité innée. Il semblerait que l'Omp31 confère à *Brucella*, par un processus encore inconnu, la capacité de résister à l'action cytotoxique des lymphocytes T- $\gamma\delta$ (Liautard, Ouahrani-Bettache et al. 2007).



D. *Brucella*, son système flagellaire

1. *Ce que l'analyse du génome de B. melitensis 16M nous a appris*

Contrairement à la plupart des α -protéobactéries, *Brucella* a été longtemps considérée comme une bactérie non-flagellée et non-mobile. Néanmoins, l'obtention de la séquence du génome complet de *Brucella melitensis* 16M en 2002 a permis de mettre en évidence la présence de gènes nécessaires à l'assemblage d'un flagelle fonctionnel (**Fig. 18**). Les 31 gènes identifiés sont répartis sur le petit chromosome en trois loci différents (DelVecchio, Kapatral et al. 2002). Bien que les gènes nécessaires à la formation d'un flagelle, à sa rotation ainsi qu'à la régulation de l'expression de ses gènes structuraux soient présents, on ne retrouve aucun gène codant pour un système de chimiotactisme. De plus, il apparaît que les séquences codantes de *fliF* (monomère du MS-ring) et *flhA* (composant de la machinerie d'exportation), sont interrompues par un codon 'stop' (UAG) (Fretin, Fauconnier et al. 2005). Ainsi, les gènes flagellaires ont été considérés comme cryptiques (Moreno and Moriyon 2002) et *Brucella* comme non-flagellée et non-mobile.

2. *Brucella melitensis 16M produit un flagelle gainé*

Le criblage d'une banque de mutants transpositionnels de *Brucella melitensis* 16M a démontré que le gène flagellaire *fliF*, codant pour le monomère du MS-ring, est requis pour l'infection en modèle murin (Lestrade, Dricot et al. 2003). Dès lors, il se peut que *Brucella melitensis* 16M produise un flagelle de manière transitoire au cours de l'infection (Fretin, Fauconnier et al. 2005).

Par la suite, l'utilisation d'un gène rapporteur fusionné au promoteur du gène *fliF* a démontré que ce dernier était actif de manière transitoire, au début de la phase exponentielle de croissance, au cours d'une croissance en milieu liquide riche 2YT (Fretin, Fauconnier et al. 2005) (**Fig. 19-A**).

De plus, des données ont démontré que deux protéines localisées dans la partie supérieure du flagelle, *FliC* (le monomère du filament) et *FlgE* (le monomère protéique formant le coude), étaient également produites au début de la phase exponentielle de croissance en milieu liquide riche 2YT (Fretin, Fauconnier et al. 2005) (**Fig. 19-B**).

Finalement, après avoir récupéré un extrait bactérien de *Brucella melitensis* 16M à partir d'une culture liquide en début de phase exponentielle, Fretin et al. observèrent pour la première fois un appendice polaire. Celle-ci s'avéra gainée, car recouverte par du LPS (Fretin, Fauconnier et al. 2005) (**Fig. 20**).

3. *Le flagelle de Brucella, un système régulé*

3.1. *VjbR et FtcR, deux régulateurs transcriptionnelles*

Depuis la mise évidence de l'existence d'un flagelle chez *Brucella*, deux protéines majeures régulant l'expression des gènes flagellaires au niveau transcriptionnel ont été décrites, *FtcR* (Flagellar two-component regulator) et *VjbR* (Vacuolar hijacking *Brucella* regulator).

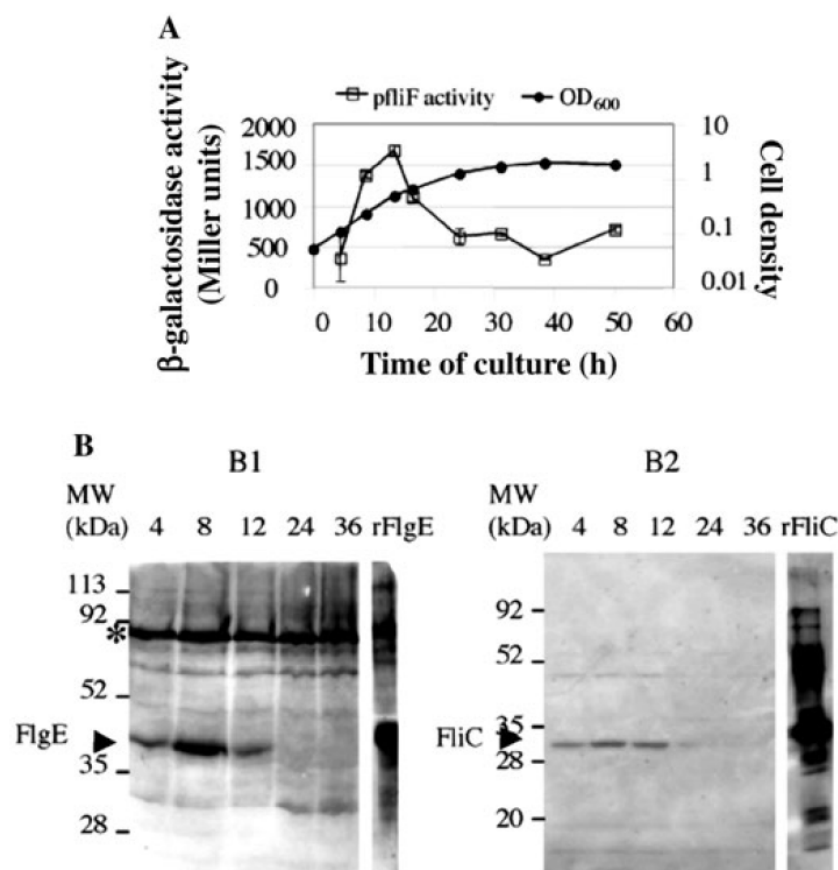


Figure 19. Le promoteur du gène *fliF* ainsi que les protéines FlgE et FliC sont respectivement activé et produites de manière transitoire chez *B. melitensis* 16M (d'après Fretin et al. 2005). Les gènes impliqués dans l'assemblage du flagelle de *Brucella melitensis* 16M semblent être exprimés uniquement au début de la phase exponentielle de croissance en culture *in vitro* en milieu riche (2YT) (A). Sur base d'un test de dosage de la β -galactosidase, l'activité maximale du promoteur du gène *fliF* est observée après environ 10h de croissance en milieu

liquide riche 2YT, soit au début de la phase exponentielle de croissance (ligne avec carrés). (B) L'évaluation de l'abondance des protéines FlgE (B1) et FliC (B2) révèle que celles-ci sont également produites en début de phase exponentielle de croissance en milieu riche.

L'analyse de la séquence nucléotidique du gène *ftcR* de *Brucella*, bien conservée chez d'autres α -protéobactéries, a démontré que celui-ci codait pour un régulateur d'un système de régulation à deux composants (Leonard, Ferrooz et al. 2007). Chez *Brucella*, la protéine FtcR est considérée comme le régulateur maître permettant l'induction de l'expression des gènes du système flagellaires. Il a été démontré que FtcR se fixe de manière directe et spécifique sur la région promotrice du gène *fliF* (Leonard, Ferrooz et al. 2007). Par ailleurs, l'utilisation d'une souche mutée pour le gène *ftcR* est associée à une absence d'activité du promoteur du gène *fliF* ainsi qu'à l'absence de production des protéines FlgE et FliC (Leonard, Ferrooz et al. 2007).

La protéine VjbR, un régulateur transcriptionnel associé au « quorum sensing », est également décrite comme un activateur du système flagellaire de *Brucella* (Delrue, Deschamps et al. 2005). Alors que chez la souche sauvage, le promoteur du gène *fliF* est actif en début de phase exponentielle, l'utilisation d'une souche de *Brucella melitensis* 16M mutée pour le gène *vjbR* est associée à une forte diminution de l'activité de ce promoteur au cours d'une croissance en milieu liquide riche. La protéine VjbR semble réguler l'expression des gènes flagellaires en contrôlant l'expression du régulateur maître FtcR. En effet, l'utilisation d'un plasmide rapporteur montre que l'activité du promoteur du gène *ftcR* est diminuée de moitié dans une souche de *Brucella melitensis* 16M mutée pour le gène *vjbR* par rapport à la souche sauvage. En régulant l'expression du gène *ftcR*, la protéine VjbR se retrouverait ainsi en amont de celle-ci dans la cascade de régulation du système flagellaire (Leonard, Ferrooz et al. 2007).

Néanmoins, bien que plusieurs régulateurs impliqués dans l'expression des gènes flagellaires de *Brucella* aient été identifiés, leur expression ne semble pas répondre au schéma classique de hiérarchisation observé chez *Salmonella typhimurium* (Fig. 8). En effet, il a été démontré que des protéines distales du flagelle (FliC et FlgE), normalement produites en fin d'assemblage, étaient produites dans des souches mutées pour des gènes codant des protéines basales, comme FliF (Ferrooz, données non publiées).

3.2. FlbT et FlaF, deux régulateurs post-transcriptionnels de *fliC*

Même si aucune hiérarchisation ne semble réguler l'expression des gènes flagellaires chez *Brucella*, la production de certaines parties du flagelle est bel et bien régulée. Par exemple, la production de la flagelline est régulée au niveau post-transcriptionnel par l'intermédiaire des protéines FlbT et FlaF.

Chez *Caulobacter crescentus*, un autre membre de la famille des α -protéobactéries, le gène *flbT* code pour une protéine empêchant la production de la flagelline (Mangan, Malakooti et al. 1999). FlbT, en se liant au niveau de la région 5' non-traduite de l'ARNm de la flagelline de *Caulobacter*, régule la production de celle-ci au niveau post-transcriptionnel. La liaison de FlbT sur l'ARNm de *fliC* stabilise une conformation structurale qui défavorise sa traduction et entraîne sa dégradation (Anderson and Gober 2000).

La protéine FlbT est également présente chez *Brucella melitensis* 16M mais celle-ci aurait un rôle inverse par rapport à son homologue chez *Caulobacter*. En effet, il apparaît qu'une souche de *Brucella* délétée pour le gène *flbT* est incapable de produire de la flagelline, même si le promoteur du gène codant celle-ci est toujours actif. De plus, l'utilisation de la

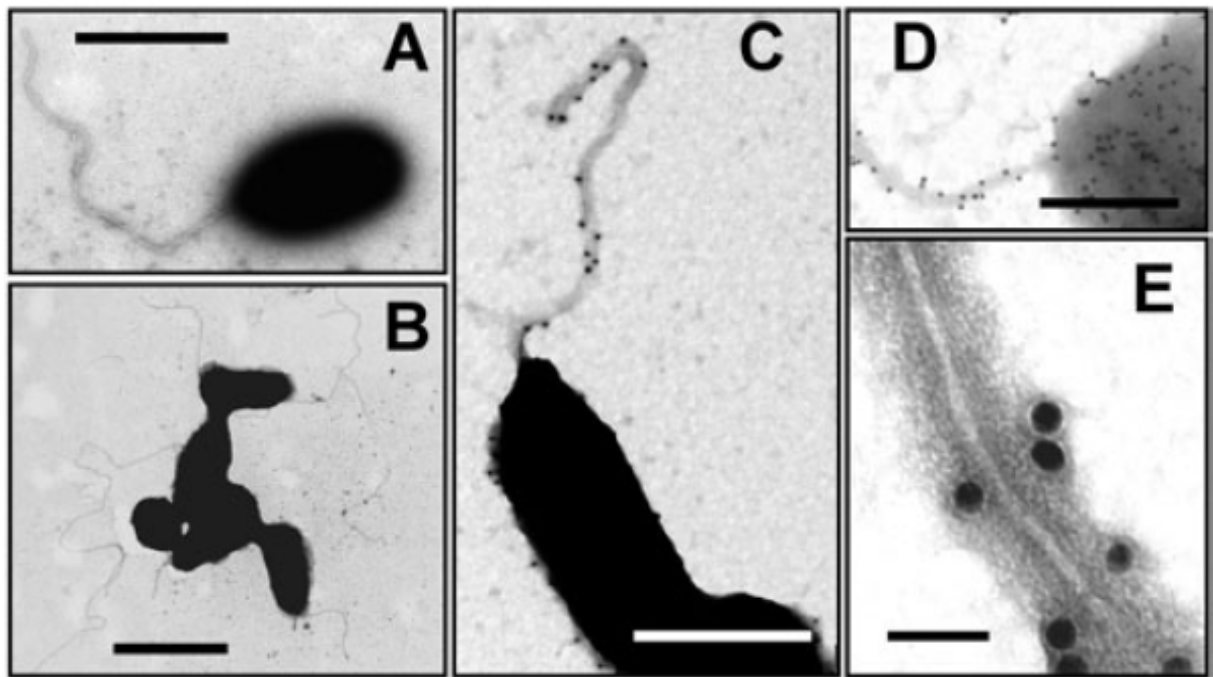


Figure 20. Visualisation du flagelle de *Brucella melitensis* 16M en microscopie électronique à transmission (d'après Fretin et al., 2005). (A-E) Une coloration à l'acétate d'uranyl permet de visualiser le flagelle polaire de *Brucella melitensis* 16M. (C-E) Un marquage avec des anticorps monoclonaux reconnaissant le LPS de *Brucella* et des anticorps secondaires couplés à des billes d'or démontre la nature gainée du flagelle; celui-ci étant entièrement recouvert par un manteau de LPS. (E) Un agrandissement supérieur du flagelle permet d'observer le filament central, recouvert de la gaine de LPS. Les bars représentent 1 μm (A-B), 0,5 μm (C-D) et 50 nm (E).

technique de PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR) montre que la quantité d'ARN messager de la flagelline chez ce mutant chute de manière considérable (Ferroz, données non publiées). Ainsi, ces données suggèrent que, à l'inverse de ce qui est observé chez *Caulobacter*, FlbT soit un régulateur post-transcriptionnel capable de stabiliser l'ARN messager de la flagelline chez *Brucella* et donc d'en activer la production.

Parallèlement, une protéine ayant une action antagoniste à FlbT a été mise en évidence chez *Caulobacter crescentus*. Contrairement à FlbT, FlaF est un activateur de la production de la flagelline chez ce microorganisme (Llewellyn, Dutton et al. 2005). À l'instar des autres membres de la famille des α -protéobactéries possédant le gène *flbT*, le gène *flaF* est également présent chez *Brucella*. Etant donné que la surexpression du gène *flaF* dans une souche sauvage de *Brucella melitensis* 16M inhibe la production de flagelline, il semble que cette protéine soit également un antagoniste de FlbT chez *Brucella* (Ferroz, données non publiées).

4. *Brucella* recourt à son flagelle pour persister dans son hôte : controverse

Depuis la découverte du système flagellaire de *Brucella*, certaines études lui ont attribué un rôle prépondérant à l'aboutissement de son cycle infectieux. Cet appendice serait en effet nécessaire à la persistance à long terme de *Brucella* au sein de son hôte eucaryote.

Tout d'abord, le crible d'une banque de mutants obtenu par STM (Signature-Tagged Mutagenesis) dans un modèle infectieux caprin a montré que le gène *flgF*, codant pour une protéine basale du flagelle, était impliqué dans la persistance de *Brucella melitensis* 16M dans son hôte. En effet, la virulence d'un mutant portant un transposon dans ce gène est atténuée par rapport à la souche sauvage 21 jours post-infection (Zygmunt, Hagius et al. 2006).

Parallèlement, plusieurs mutants de gènes flagellaires, codant pour des protéines de différentes parties du flagelle (*flhA*, *motB*, *fliF*, *flgI*, *flgE* et *fliC*), ont été construits par intégration d'un plasmide disruptif et leur virulence a été évaluée dans un modèle d'infection murin. Contrairement à ce qui avait été décrit par Lestrade et al. pour un mutant *fliF*, aucun mutant testé ne présenta d'atténuation après 5 jours d'infection en souris. Néanmoins, toutes les souches disruptées pour les gènes cités ci-dessus présentaient une atténuation par rapport à la souche sauvage après 4 semaines d'infection (Fretin, Fauconnier et al. 2005).

Cependant, il apparaît qu'aucun des mutants flagellaires testés ne présente d'atténuation par rapport à une souche sauvage de *Brucella* dans les modèles d'infection cellulaire testés (Fretin, Fauconnier et al. 2005).

Mais, Fretin et al. ont également montré que les gènes flagellaires sont probablement exprimés au cours du processus infectieux de *Brucella* en cellule. En effet, la fusion du promoteur des gènes *fliF* (Fretin, Fauconnier et al. 2005) et *flgE* (L. Schiavolin, données non publiées) au gène codant la GFP (Green Fluorescent Protein) montre qu'ils sont actifs lors d'une infection en cellule.

Dès lors, bien que l'expression d'un flagelle par *Brucella* ne paraisse pas crucial afin d'assurer son entrée ainsi que sa réplication en cellule, les données obtenues *in vivo* suggèrent que cet appendice doit être requis, à un moment donné de l'infection, pour sa virulence au sein de son hôte.

Cependant, les gènes flagellaires sont organisés en opéron. Il se peut donc que la création de mutant par intégration de plasmide s'accompagne d'effet polaire. Ainsi, afin d'éliminer ce risque, de nouveaux mutants des gènes *fliF* et *fliC* ont été construits par remplacement allélique. Bien que l'atténuation précédemment décrite du délétant *fliF* fût confirmée après 4 semaines d'infection en souris, un phénotype opposé fut observé pour l'autre mutant. En effet, il est apparu que le mutant *fliC* présentait un phénotype de virulence exacerbé, à 4 semaines d'infection, par rapport à la souche sauvage. Par ailleurs, l'utilisation d'une souche mutée pour *flbT* a montré le même phénotype que le mutant *fliC*. Le profil de virulence exacerbée observé en modèle d'infection murin serait donc directement lié à l'absence de flagelline (Ferooz, données préliminaires non publiées).

Objectif du mémoire

Objectif du mémoire

Brucella melitensis 16M est une bactérie intracellulaire facultative capable de manipuler le trafic intracellulaire de sa vacuole et de tempérer l'activation du système immunitaire de l'hôte afin de survivre et se répliquer au sein de phagocytes professionnels et non-professionnels. À cette fin, ce pathogène dispose d'une série de facteurs de virulence identifiés, dont les mécanismes d'action sont plus ou moins compris (**cfr. section C.2. de l'introduction**). Au cours de ce mémoire, nous nous sommes attachés à comprendre le rôle de la flagelline (FliC) de *B. melitensis* 16M lors du processus infectieux. Cette protéine constituerait le monomère du filament d'un flagelle auquel un rôle dans la virulence de *Brucella* en modèles d'infection murin et caprin a été proposé. Cependant, le rôle de la flagelline de *B. melitensis* 16M au cours de l'infection est controversé. En effet, une souche délétée pour *fliC*, obtenue par remplacement allélique présenterait un phénotype différent des mutants des autres gènes flagellaires, puisqu'une virulence exacerbée a été observée après 4 semaines d'infection en modèle murin. Cette observation préliminaire suggère que la flagelline de *Brucella* pourrait être un PAMP important dans le contrôle de l'infection, comme cela est décrit pour d'autres bactéries.

Dans un premier temps, nous avons cherché à confirmer et à caractériser le phénotype de la souche *fliC::aphA4* en modèle d'infection murin. Nous avons également tenté de prouver que ce phénotype n'est pas dû à un effet polaire en le complétant par l'apport en *trans* d'une copie de *fliC*.

Ensuite, une analyse bioinformatique de la flagelline de *B. melitensis* 16M, se focalisant sur les différentes séquences pouvant la définir comme un PAMP, a été réalisée. La capacité de réplication du mutant *fliC* a également été testée *in vitro* et *ex vivo*, lors de l'infection de macrophages. Le profil d'activation de ces derniers en cours d'infection a également été caractérisé.

Finalement, nous avons voulu savoir si la flagelline de *B. melitensis* 16M était capable d'activer l'inflammasome. Pour ce faire, nous avons voulu savoir si elle pouvait être responsable de la cytotoxicité de ce pathogène et nous avons évalué, grâce à une souche produisant constitutivement de la flagelline, si celle-ci était sécrétée par *Brucella in vitro*.

Résultats

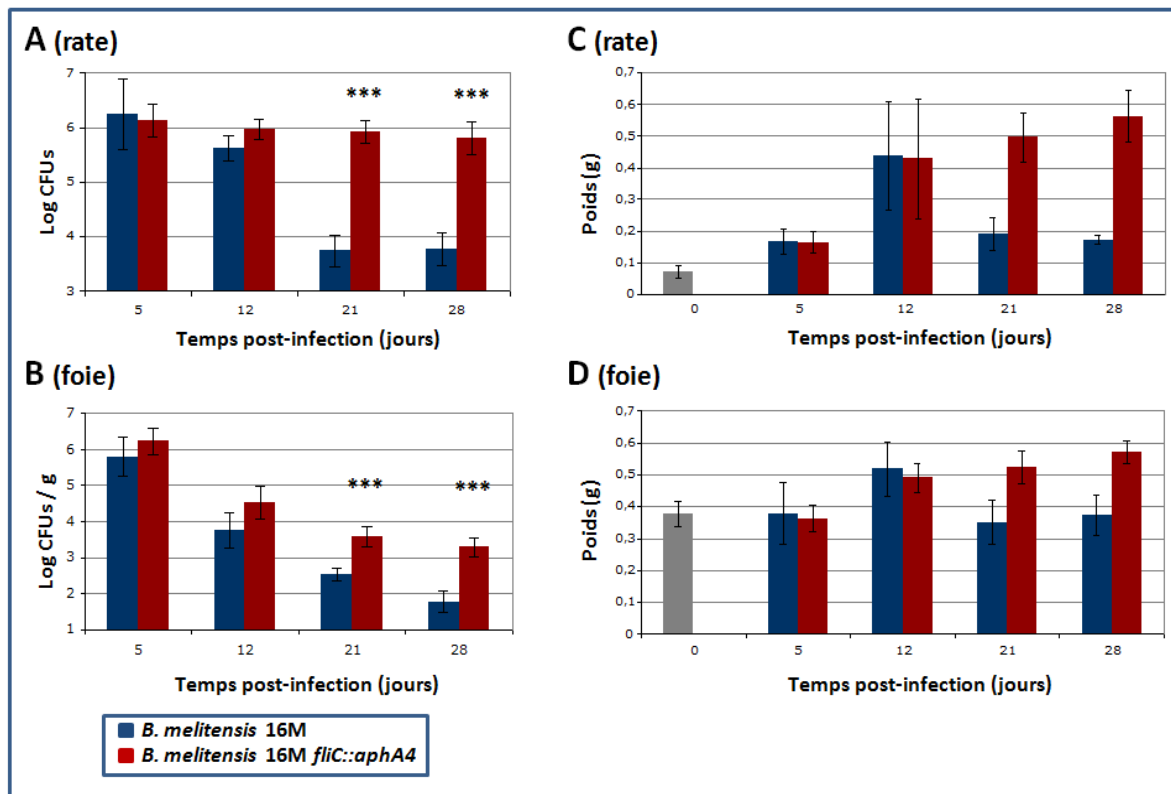


Figure 21. Comparaison de la virulence de la souche sauvage de *B. melitensis* 16M et du mutant *fliC::aphA4* après 5, 12, 21 et 28 jours d'infection en souris BALB/c. Les graphiques A et B expriment l'évolution de la virulence des différentes souches en logarithmes du nombre de CFUs, respectivement par rate et par gramme de foie. La charge bactérienne est significativement plus élevée ($P < 0,001$) dans le cas de l'infection causée par le mutant *fliC::aphA4* à 21 et 28 jours post-infection. Les graphiques C et D expriment respectivement l'évolution du poids moyen de la rate et d'un lobe latéral du foie de la souris au cours de l'infection. Les souris infectées par la souche *fliC::aphA4* de *B. melitensis* 16M présentent une splénomégalie et une hépatomégalie plus importante ($P < 0,001$) par rapport à la souche *wild-type* après 21 et 28 jours d'infection. (en gris, poids moyen d'une rate et d'un lobe latéral de foie de souris naïve). (A et B: Résultat représentatif d'une expérience répétée 3 fois de manière indépendante; C et D: Résultat d'une expérience) (Les barres d'erreurs représentent des écarts-types calculés sur des groupes de 6 souris. Test statistique: ANOVA 1)

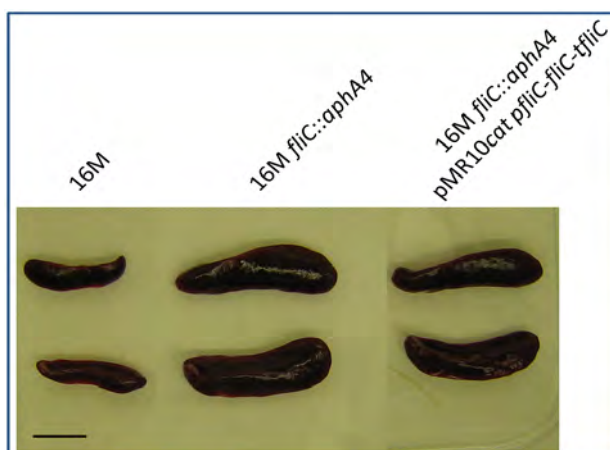


Figure 22. Illustration de rates provenant de souris BALB/c infectées par la souche sauvage de *B. melitensis* 16M, le mutant *fliC::aphA4* et la souche de complément *B. melitensis* 16M *fliC::aphA4* pMR10cat *pflC-fliC-tfliC* 28 jours après infection. Les souris infectées par le mutant *fliC::aphA4* et par la souche de complément présentent une splénomégalie plus importante que celles infectées par la souche *wild-type*. (la barre d'échelle représente 1 cm).

Résultats

A. Caractérisation de la souche *B. melitensis* 16M *fliC*::*aphA4* en modèle d'infection murin

1. *Cinétique de virulence in vivo de la souche *B. melitensis* 16M *fliC*::*aphA4**

Bien que Fretin et al. aient démontré qu'une souche de *Brucella melitensis* 16M mutée dans le gène *fliC* (mutation polaire) a une virulence atténuée après 4 semaines en modèle d'infection murin (Fretin, Fauconnier et al. 2005), une expérience préliminaire utilisant le mutant non-polaire *B. melitensis* 16M *fliC*::*aphA4* ne produisant pas de flagelline a montré un phénotype opposé (J. Ferooz, données non publiées). En effet, la charge bactérienne de la rate de souris BALB/c infectées par ce mutant serait significativement plus élevée après 4 semaines par rapport à l'infection par la souche sauvage.

Afin de confirmer le phénotype hypervirulent décrit pour la souche *B. melitensis* 16M *fliC*::*aphA4*, des groupes de souris BALB/c ont été infectés par ce mutant et par la souche *wild-type* de *Brucella melitensis* 16M. Chaque souris a reçu une dose infectante de 4.10^4 CFUs (*Colony Forming Units*) bactériens par injection intrapéritonéale. Des dilutions de la suspension bactérienne destinée à infecter les souris ont été étalées sur 2YT agar et les CFUs comptées après incubation afin de contrôler la dose infectante.

Les souris ont été sacrifiées 5 jours, 12 jours, 21 jours et 28 jours après infection et leur rate ainsi qu'un lobe de leur foie ont été récupérés. Les bactéries ont été récupérées après lyse des cellules des organes et la virulence de chacune des souches a été évaluée par le comptage de CFUs de dilutions sériées étalées sur 2YT agar.

Les résultats montrent qu'après 5 et 12 jours d'infection (**Fig. 21-A/B**), aucune différence significative en termes de charge bactérienne n'est observable dans la rate et dans le foie entre le mutant *fliC*::*aphA4* et la souche sauvage. En revanche, l'analyse réalisée à 3 et 4 semaines post-infection révèle que la virulence du délétant est exacerbée en comparaison à la souche sauvage (de 2,18 log et 1,06 log à 3 semaines et de 2,05 log à 1,53 log à 4 semaines, respectivement dans la rate et le foie). Le délétant semble donc se maintenir plus longtemps dans la rate et dans le foie que la souche *wild-type* ; il est moins vite éliminé.

Parallèlement à ce phénotype hypervirulent, l'analyse des rates et des lobes de foie à 21 et 28 jours post-infection montre que les souris infectées par le mutant *fliC*::*aphA4* présentent une splénomégalie ainsi qu'une hépatomégalie plus importante que celles infectées par la souche *wild-type* (**Fig. 21-C/D**). En effet, comparées aux rates et aux lobes latéraux de foie infectés par la souche sauvage, les rates infectés par le délétant apparaissent plus grandes (**Fig. 22**) et au moins deux fois plus lourdes en moyenne (**Fig. 21-C**).

De plus, il est intéressant de faire remarquer que même en exprimant la virulence du mutant *fliC*::*aphA4* en log de CFUs par gramme de rate, celle-ci reste supérieure de manière très significative en comparaison à la souche sauvage (données non montrées).

Ces données confirment le phénotype d'hypervirulence du mutant *fliC*::*aphA4* en modèle d'infection murin 4 semaines après infection, décrit au cours d'une expérience préliminaire (J. Ferooz, données non publiées).

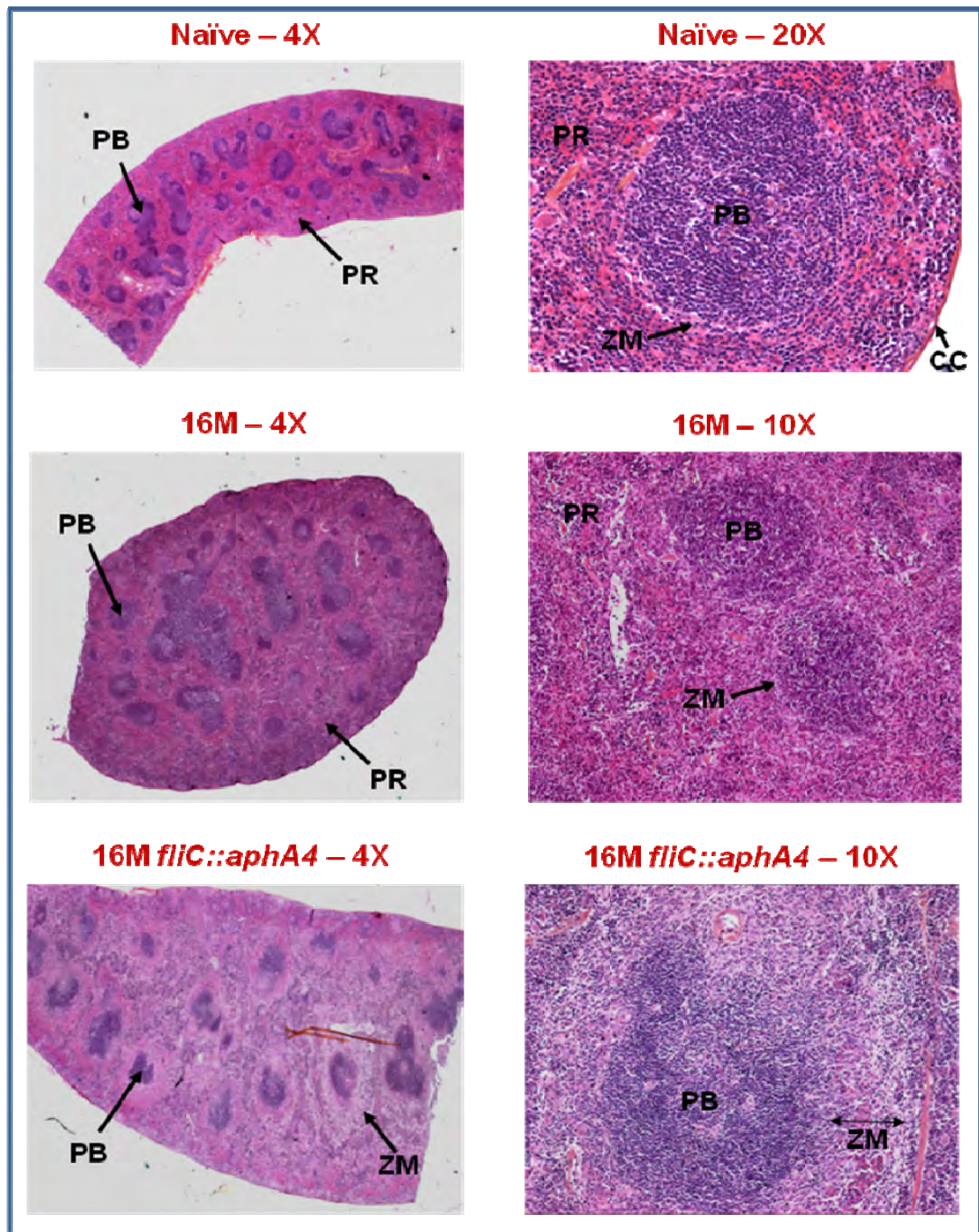


Figure 23. Analyse histopathologique de rates de souris BALB/c infectées par la souche *wild-type* et par *B. melitensis* 16M *fliC::aphA4* après 28 jours d'infection. (PB. pulpe blanche, PR. pulpe rouge, CC. capsule conjonctive, ZM. zone marginale). Des rates de souris naïves ont été utilisées comme contrôle. L'ensemble des coupes spléniques ont été colorées à l'HES (Hématoxiline-éosine-safran). Contrairement aux rates infectées par la souche sauvage, celles infectées par le mutant *fliC::aphA4* montre un profil inflammatoire important. La pulpe rouge apparaît désorganisée et œdémateuse et la pulpe blanche est mal délimitée. On observe également une importante perte d'intégrité au niveau de la zone marginale.

2. Analyse histologique de rates infectées par la souche *B. melitensis* 16M *fliC::aphA4*

Afin de déterminer si l'importante splénomégalie observée chez des souris infectées par le mutant *fliC::aphA4* à des temps tardifs d'infection pouvait être liée à une splénite, les rates de souris infectées par la souche sauvage et le mutant ont été récupérées 28 jours post-infection. Des coupes ont été préparées et colorées à l'HES (Hématoxiline-éosine-safran) pour réaliser une analyse histologique splénique.

Des rates provenant de souris naïves, c'est-à-dire non-infectées, ont été utilisées comme contrôle et illustrent l'architecture histologique classique de cet organe (**Fig. 23**). Celui-ci possède une capsule de tissu conjonctif et est composé de 2 structures distinctes : la pulpe rouge, riche en macrophages et en globules rouges, et la pulpe blanche, zone lymphoïde riche en lymphocytes T et B. Celles-ci sont séparées l'une de l'autre par une zone de filtration riche en macrophages spécialisés et en lymphocytes B appelée zone marginale.

Comme l'illustre la **figure 23**, les rates provenant de souris infectées par la souche *wild-type* de *B. melitensis* 16M présentent une organisation tissulaire classique. La pulpe rouge ne semble pas affectée, les follicules lymphoïdes de la pulpe blanche sont bien délimités et la zone marginale est comparable à celle observée dans une rate de souris naïve. En revanche, les rates de souris infectées par le mutant *fliC::aphA4* présentent des modifications tissulaires drastiques, tant dans la pulpe rouge que dans la pulpe blanche, reflétant une réponse inflammatoire importante. En effet, on peut observer une perte majeure d'intégrité au niveau de la pulpe rouge caractérisée par un profil œdémateux. Le contour des follicules lymphoïdes est également mal délimité en raison de la désorganisation de la zone marginale.

L'ensemble de ces données suggèrent que la flagelline de *B. melitensis* 16M pourrait être un PAMP reconnu par le système immunitaire de l'hôte puisque son absence altère les capacités de l'hôte à contrôler l'infection.

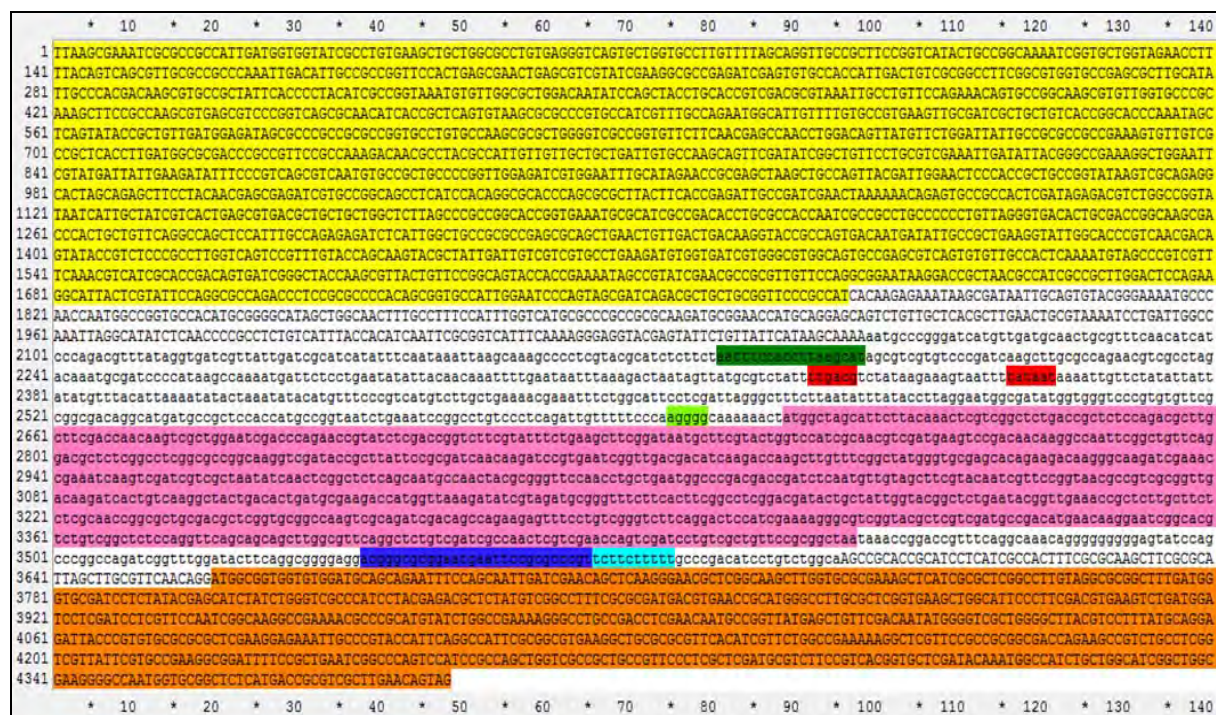


Figure 24. Identification des séquences régulatrices de *fliC*. (en jaune, l'ORF BMEII0149 codant pour une 'extracellular serine protease' ; en orange, l'ORF BMEII0151 codant pour la protéine FliF). Le promoteur de *fliC*, *pflIC*, serait composé d'un site putatif de liaison au régulateur transcriptionnel VjbR (vert foncé, nucléotides -428 à -411 par rapport à l'ATG)), de séquences consensus reconnues par le facteur de transcription $\sigma 70$ (rouge, nucléotides -277 à -272 et -253 à -248 par rapport à l'ATG) et d'un site putatif de liaison au ribosome (vert clair, nucléotides -14 à -10 par rapport à l'ATG). Un terminateur 'fort', comprenant des répétitions inverses (bleu foncé), pouvant former une structure en épingle à cheveux (« hairpin »), ainsi qu'un motif polypyrimidique (bleu clair) (nucléotides +81 à +119 par rapport au codon *stop* de *fliC*), a été identifié et nommé *tfliC*. Les nucléotides représentés par des lettres minuscules forment la séquence *pflIC-fliC-tfliC* de 1537 paires de bases sélectionnée pour la construction du plasmide de complément.

B. Test de complémentation de *B. melitensis* 16M *fliC::aphA4* par le pMR10cat *pfliC-fliC-tfliC*

Afin de s'assurer que l'hypervirulence de la souche *B. melitensis* 16M *fliC::aphA4* n'est pas due à un effet polaire, un plasmide permettant de ramener en *trans* une copie de *fliC* flanquée de ses séquences régulatrices a été construit. En utilisant cette stratégie, on espère que la séquence codante *fliC* apportée en *trans* et la flagelline soient respectivement régulée et produite de la même façon que dans la souche sauvage.

1. Construction du plasmide de complémentation « pMR10cat *pfliC-fliC-tfliC* »

1.1. Identification des séquences régulatrices du gène *fliC*

Les séquences régulatrices putatives de *fliC* ont été identifiées (**Fig. 24**). En amont, un site susceptible d'être reconnu par le régulateur VjbR (entre les nucléotides -428/-411 par rapport au codon start ATG de *fliC*) (de Jong, Sun et al. 2008) ainsi que les séquences consensus reconnues par le facteur de transcription $\sigma 70$ (deux boîtes putatives respectivement entre les nucléotides -277/-272 et -253/-248 par rapport à l'ATG de *fliC*) (Ferooz, données non publiées) ont été proposées. Un site putatif de liaison pour le ribosome (RBS, *Ribosome Binding Site*) a également été identifié entre les nucléotides -14 et -10 par rapport à l'ATG. Cette région de 550 paires de bases en amont de *fliC* a donc été considérée comme le promoteur de *fliC* et appelé *pfliC*. En aval de *fliC*, on a mis en évidence la présence d'un terminateur transcriptionnel fort entre les nucléotides +81 et +118 par rapport au codon stop de *fliC*. Celui-ci se compose de répétitions inverses, pouvant former une structure en épingle à cheveux (« hairpin ») et d'un motif polypyrimidique. Les 138 nucléotides en aval de *fliC* ont été considérés comme le terminateur de ce gène, appelé *tfliC*.

La stratégie de clonage de la séquence *pfliC-fliC-tfliC* est schématisée à la **figure 25** ; celle-ci a été amplifiée par PCR et clonée dans le vecteur pMR10cat, après passage dans le plasmide intermédiaire pGEM. Le pMR10cat est un vecteur à large gamme d'hôte, à faible nombre de copies chez *Brucella* et qui présente une grande stabilité, de par son système de partition. En plus d'une cassette de résistance à la kanamycine, il confère également la résistance au chloramphénicol (gène *cat*).

1.2. Amplification par PCR de la séquence *pfliC-fliC-tfliC*

Les amorces oligonucléotidiques définies afin d'amplifier la séquence *pfliC-fliC-tfliC* et de la cloner dans le pMR10cat sont appelées F1 et F2. Leur séquence est disponible dans la section « matériels et méthodes ». L'amorce F1 s'hybride à 550 paires de base en amont du codon start du gène *fliC* et possède en 5' une séquence correspondant au site de restriction BamHI. L'amorce F2 s'hybride à 138 paires de base en aval du codon stop de *fliC* et possède en 5' une séquence correspondant au site de restriction XbaI. L'utilisation de ces sites de restriction, présents dans le site de clonage multiple (MCS) du pMR10cat, permet un clonage directionnel en sens inverse du promoteur *pLac* et nous évite une éventuelle surexpression de l'insert.

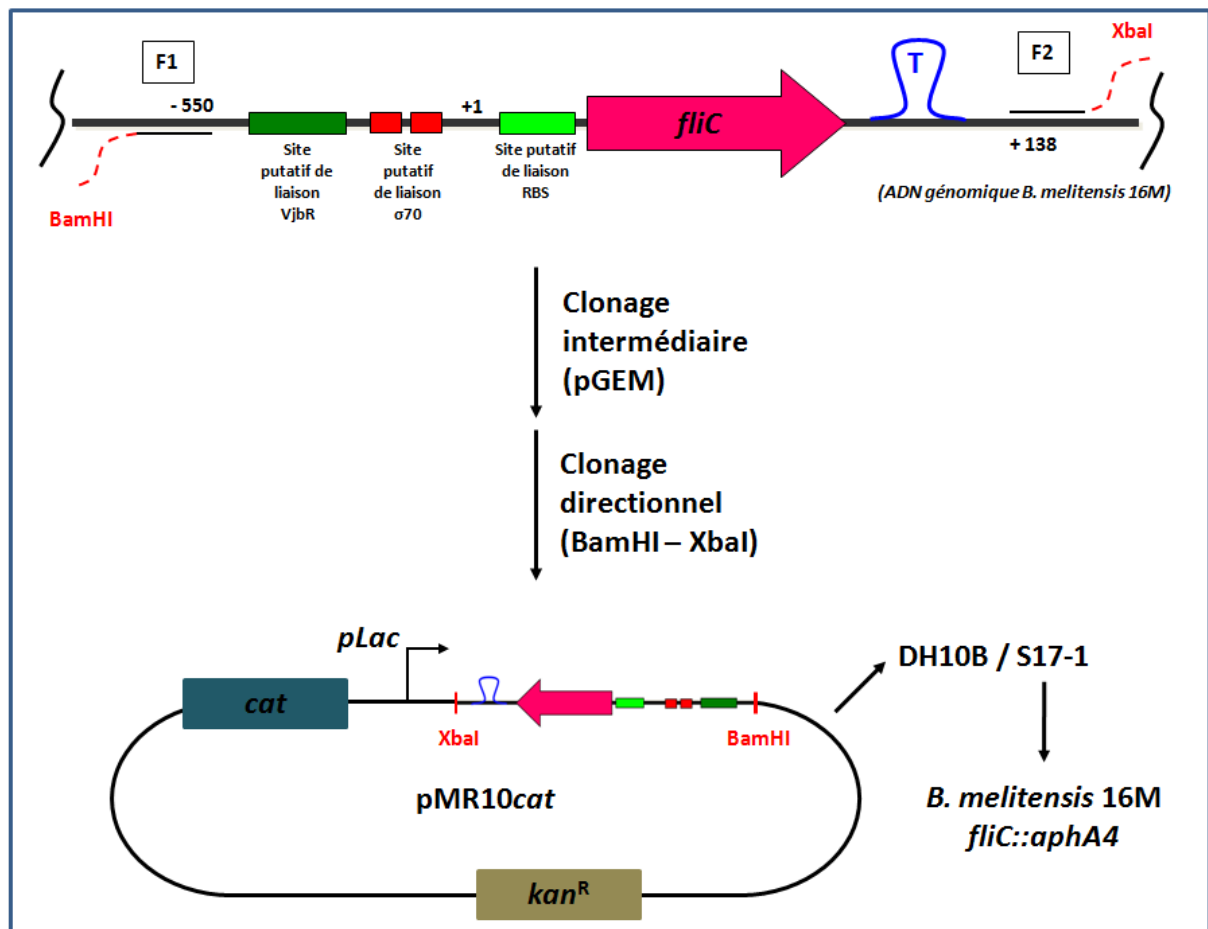


Figure 25. Représentation schématique de la stratégie adoptée pour la construction d'un plasmide de complémentation pour la souche *Brucella melitensis* 16M *fliC::aphA4*. Une paire d'amorces permettant d'amplifier l'ORF *fliC* flanquée de ses séquences régulatrices a été définie. Le primer F1 s'hybride 550 paires de bases en amont de l'ATG de l'ORF *fliC* tandis que le primer F2 s'hybride 138 paires de bases en aval du codon *stop* de celle-ci. Les oligonucléotides F1 et F2 possèdent à leur extrémité 5' respectivement un site de restriction reconnu par les enzymes BamHI et XbaI, permettant le clonage en sens inverse du *pLac* dans le pMR10cat, après le clonage dans le plasmide intermédiaire pGEM. Le vecteur obtenu « pMR10cat *pfliC-fliC-tfliC* » a été amplifié dans la souche DH10B d'*E. coli* et transformé dans la souche S17-1 d'*E. coli* compétente, permettant son transfert par conjugaison chez *B. melitensis* 16M *fliC::aphA4*.

L'amplification de la séquence *pfliC-fliC-tfliC* (1553 paires de bases), réalisée sur une préparation d'ADN génomique de *Brucella melitensis* 16M, a été contrôlée par migration sur gel d'agarose (**Fig. 26-A**).

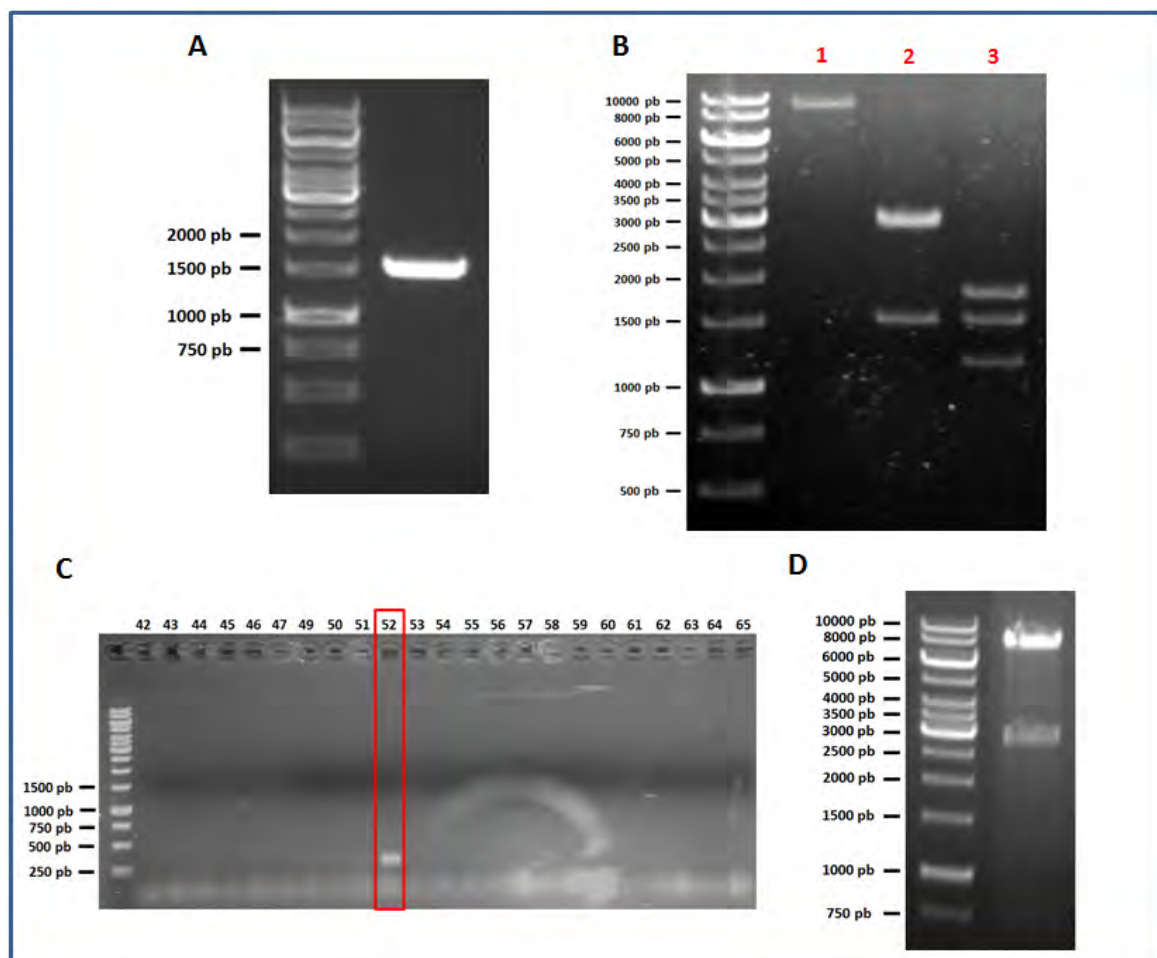


Figure 26. Résultats de l'électrophorèse en gel d'agarose des différents produits de PCR et de restrictions diagnostiques réalisées dans le cadre de la construction du plasmide de complément « pMR10cat *pfliC-fliC-tfliC* ». (A) Visualisation de l'amplicon *pfliC-fliC-tfliC* de 1553 paires de bases obtenu par PCR sur de l'ADN génomique de *Brucella melitensis* 16M, à l'aide des primers F1 et F2. (B) 1. pMR10cat restreint par XbaI et BamHI et purifié sur colonne (9697 et 67 paires de bases). 2. pGEM *pfliC-fliC-tfliC* restreint par XbaI et BamHI (3025 et 1543 paires de bases) 3. Produit de restriction du pGEM *pfliC-fliC-tfliC* par XbaI, BamHI et ScaI après purification sur colonne (1835, 1543 et 1190 paires de bases). (C) PCR sur colonies de DH10B transformées par le produit de ligation du *pfliC-fliC-tfliC* dans le pMR10cat. Elle fut réalisée à l'aide des primers F7 et F8, permettant d'amplifier un fragment de l'ORF de *fliC* de 289 paires de bases. Parmi 96 clones testés, un seul fut positif (clone 52). (D) Vérification de la présence et de l'orientation de l'insert *pfliC-fliC-tfliC* au sein du pMR10cat *pfliC-fliC-tfliC* du clone 52. Les fragments observés après restriction par l'enzyme SacII de respectivement 7647, 2889 et 704 paires de bases nous assure que l'insert est présent et orienté dans le sens souhaité (Rmq : la bande de 704 paires de bases n'est pas visible sur cette photo mais est bien présente). Si l'insert avait été intégré dans l'autre sens, des fragments nucléiques de 6400, 4136 et 704 paires de bases auraient été observés.

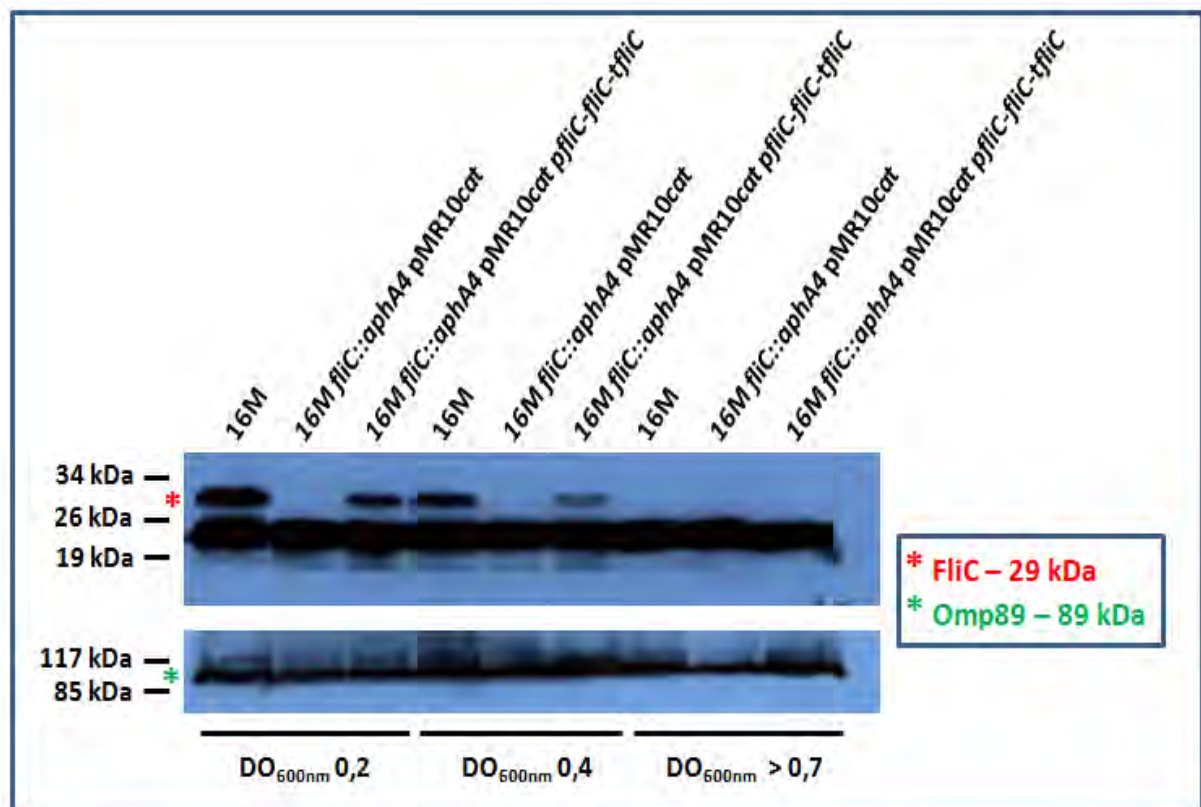


Figure 27. Profil de production de la flagelline à partir du vecteur « pMR10cat *pfliC-fliC-tfliC* » dans une souche *Brucella melitensis* 16M *fliC::aphA4* en croissance en 2YT. En utilisant une souche sauvage de *Brucella melitensis* 16M comme contrôle positif et un mutant *fliC::aphA4* doté d'un vecteur pMR10cat dépourvu d'insert comme contrôle négatif, la réalisation d'un Western Blot utilisant un anticorps spécifique de la flagelline montre que la production de cette protéine (29 kDa) dans la souche complémentée *B. melitensis* 16M *fliC::aphA4* pMR10cat *pfliC-fliC-tfliC* est comparable à celle observée dans la souche sauvage. La production de flagelline n'est en effet observée qu'en début de phase exponentielle de croissance en milieu liquide riche 2YT, soit au DO_{600nm} 0,2 et 0,4. Un anticorps spécifique de l'Omp89 (89 kDa) a été utilisé comme contrôle de chargement.

1.3. Clonage de la séquence *pfliC-fliC-tfliC* dans le vecteur intermédiaire pGEM

L'amplicon *pfliC-fliC-tfliC* a été purifié (cfr. matériels et méthodes) et cloné dans le vecteur pGEM restreint par EcoRV, une enzyme générant des bouts francs. Une souche DH10B d'*E. coli* CaCl₂ compétente a été transformée par le produit de clonage et les transformants ont été sélectionnés sur un milieu permettant l' α -complémentation (LB agar – ampicilline, X-gal, IPTG) (cfr. Matériel et méthode). Une minipréparation d'ADN plasmidique a permis de récupérer le vecteur généré, dénommé « pGEM *pfliC-fliC-tfliC* ». Celui-ci a été validé par restriction diagnostique et l'insert séquencé (**Fig.26-B**).

1.4. Clonage de la séquence *pfliC-fliC-tfliC* dans le pMR10cat

L'insert *pfliC-fliC-tfliC* » a été extrait du pGEM par les enzymes de restriction BamHI et XbaI et cloné¹, dans le sens inverse du promoteur p*Lac*, dans le pMR10cat, préalablement restreint par les mêmes enzymes. Le produit de ligation a été transformé dans une souche DH10B d'*E. coli* CaCl₂ compétente et les transformants étalés sur milieu sélectif (LB agar – chloramphénicol). Etant donné que la cassette *cat* de résistance au chloramphénicol se trouve dans le MCS du pMR10cat, un crible par α -complémentation n'a pu être effectué. Des PCR diagnostiques sur colonies, destinées à amplifier une portion du gène *fliC* (primers F7 et F8 – amplicon de 289 paires de bases) ont été réalisées et ont permis d'identifier un clone susceptible de porter le vecteur « pMR10cat *pfliC-fliC-tfliC* » (**Fig. 26-C**). Celui-ci a été obtenu après minipréparation d'ADN plasmidique et restreint afin de vérifier la présence de l'insert et son orientation (**Fig. 26-D**).

2. Obtention de la souche *B. melitensis* 16M *fliC::aphA4* pMR10cat *pfliC-fliC-tfliC*

Le vecteur « pMR10cat *pfliC-fliC-tfliC* » validé a été transformé dans une souche S17-1 d'*E. coli* CaCl₂ compétente permettant son transfert par conjugaison chez *B. melitensis* 16M *fliC::aphA4*. La souche résultante a été nommée *B. melitensis* 16M *fliC::aphA4* pMR10cat *pfliC-fliC-tfliC*.

3. Cinétique de production de flagelline *in vitro* par la souche complémentée *B. melitensis* 16M *fliC::aphA4* pMR10cat *pfliC-fliC-tfliC*

Afin de valider la souche complémentée obtenue, la production de flagelline a été testée au cours de sa croissance en milieu riche (2YT). La souche sauvage de *Brucella melitensis* 16M a été utilisée comme contrôle. Pour rappel, la flagelline est produite *in vitro* uniquement en début de phase exponentielle de croissance (DO₆₀₀ 0,15 – 0,4) en milieu riche 2YT (Fretin, Fauconnier et al. 2005). Une souche de *B. melitensis* 16M *fliC::aphA4* portant un vecteur pMR10cat dépourvu d'insert a été utilisée comme contrôle négatif. Des

¹ Le vecteur pGEM *pfliC-fliC-tfliC* a dans le même temps été restreint par l'enzyme Scal avant de réaliser la ligation de l'insert dans le pMR10cat. Ceci a été réalisé afin de minimiser le retour de l'insert *pfliC-fliC-tfliC* dans le vecteur intermédiaire pGEM et de favoriser son clonage dans le pMR10cat.

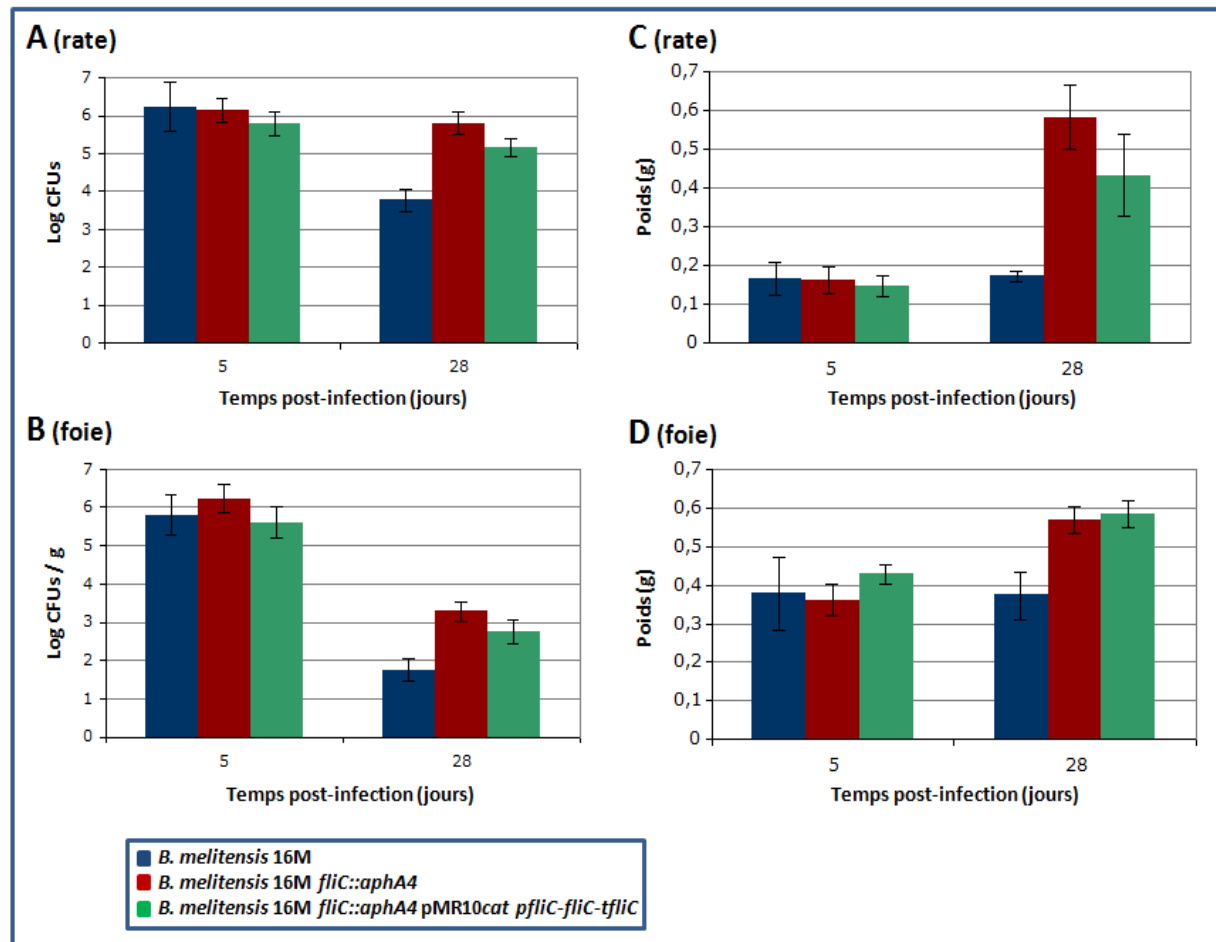


Figure 28. Tentative de complémentation du phénotype de la souche *B. melitensis* 16M *fliC::aphA4* par le pMR10cat *pfliC-fliC-tfliC* en souris BALB/c. Les graphiques A et B expriment l'évolution de la virulence des différentes souches en logarithmes du nombre de CFUs, respectivement par rate et par gramme de foie. Aucune différence significative de charge bactérienne n'est observée pour la souche de complémentation par rapport au mutant *fliC::aphA4* à 5 et 28 jours post-infection. Les graphiques C et D expriment respectivement l'évolution du poids moyen de la rate et d'un lobe latéral du foie de la souris au cours de l'infection. Les souris infectées par la souche de complémentation présentent une splénomégalie et une hépatomégalie comparable à celles infectées par le mutant *fliC::aphA4* après 5 et 28 jours d'infection. (A, B, C et D: Résultat d'une expérience) (Les barres d'erreurs représentent des écarts-types calculés sur des groupes de 6 souris. Test statistique: ANOVA 1)

échantillons protéiques de ces différentes souches ont été préparés à différentes phases de croissance et un Western Blot, utilisant un anticorps polyclonal dirigé contre la flagelline de *Brucella*, a été réalisé (cfr. Matériel et méthodes).

Comme l'illustre la **figure 27**, le profil de production de flagelline dans la souche *B. melitensis* 16M *fliC::aphA4* pMR10cat *pfliC-fliC-tfliC* est comparable à celui de la souche sauvage. En effet, la protéine est observable aux DO_{600nm} de 0,2 et 0,4 mais n'est pas détectée à une DO_{600nm} supérieure à 0,7. Néanmoins, la quantité de flagelline produite dans la souche de complémentation aux DO_{600nm} de 0,2 et 0,4 apparaît inférieure par rapport à la souche *wild-type*. La protéine FliC n'est pas détectée dans la souche *B. melitensis* 16M *fliC::aphA4* portant un vecteur pMR10cat vide. Par ailleurs, un Western Blot anti-Omp89 a été réalisé afin de contrôler les extraits protéiques réalisés et leur chargement correct.

Ces données montrent que notre vecteur de complémentation « pMR10cat *pfliC-fliC-tfliC* » est fonctionnel chez le mutant *B. melitensis* 16M *fliC::aphA4* puisque le gène *fliC* apporté en *trans* semble régulé comme la version génomique de celui-ci chez la souche sauvage.

4. Test de complémentation de *B. melitensis* 16M *fliC::aphA4* par le pMR10cat *pfliC-fliC-tfliC* en souris BALB/c

Afin de s'assurer que le profil de virulence exacerbé décrit pour la souche *B. melitensis* 16M *fliC::aphA4* n'est pas dû à un effet polaire, des groupes de souris BALB/c ont été infectés par la souche de complémentation *B. melitensis* 16M *fliC::aphA4* pMR10cat *pfliC-fliC-tfliC*, en respectant le mode d'infection décrit précédemment. Les bactéries récupérées après lyse des organes ont été étalées sur milieu 2YT et 2YT supplémenté en chloramphénicol afin de vérifier la stabilité du plasmide.

Comme l'illustrent les figures **28-A/B**, la souche *B. melitensis* 16M *fliC::aphA4* pMR10cat *pfliC-fliC-tfliC* ne possède pas le même profil de virulence dans la rate et dans le foie que la souche sauvage de *B. melitensis* 16M après 4 semaines d'infection en modèle murin. En effet, aucune différence significative en termes de charge bactérienne n'est observée pour la souche de complémentation par rapport au mutant *fliC::aphA4* 28 jours post-infection.

De plus, l'analyse des rates et des lobes de foies 28 jours post-infection montre que les souris infectées par la souche de complémentation présentent une splénomégalie ainsi qu'une hépatomégalie comparable à celles infectées par le mutant *fliC::aphA4* (**Fig. 22 et Fig. 28-C/D**).

Ces données sont discutées dans la section '**Discussion et Perspectives**' de ce travail.

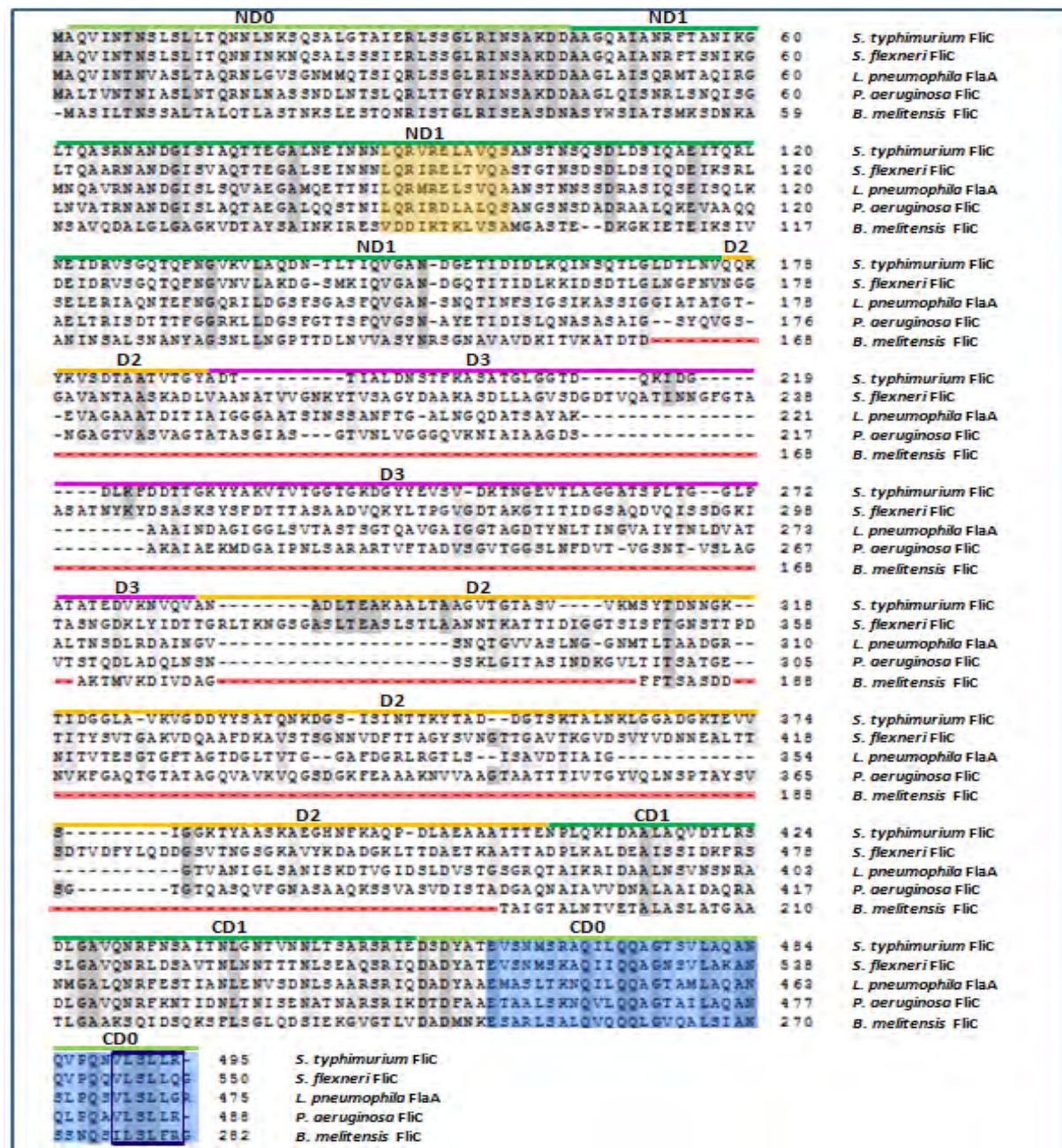


Figure 29. Alignement de séquences peptidiques de flagellines de différentes protéobactéries. Cet alignement multiple de séquences a été réalisé à l'aide du logiciel ClustalW. La position des différents domaines de la flagelline de *S. typhimurium* est exposée au dessus de la séquence de celle-ci. La flagelline de *Brucella melitensis* 16M est atypique par rapport aux flagellines classiques de *S. typhimurium*, *P. aeruginosa*, *S. flexneri* ou *L. pneumophila*. Comme illustré par les **traits rouges**, celle-ci possède environ 200 résidus en moins que les autres flagellines, correspondant aux domaines D2 et D3. À l'instar d'autres α -protéobactéries, le domaine D1 de la flagelline de *Brucella melitensis* 16M n'est pas conservé (**en jaune**) et n'est pas capable d'activer le TLR5. L'analyse de son domaine carboxy-terminal (DO), important pour la reconnaissance cytosolique par Naip5, montre que celui-ci est relativement bien conservé chez *Brucella melitensis* 16M (**en bleu clair**) et pourrait activer ce PRR. Par ailleurs, ce même domaine ne possède pas la valine identifiée comme essentielle dans le consensus peptidique (VLSLLR) responsable de l'activation du PRR Ipaf (**cadre bleu foncé**).

C. La flagelline de *Brucella melitensis* 16M serait un PAMP atypique : Analyse bioinformatique

Comme il l'a été expliqué dans la première partie de ce travail, la flagelline fait partie des rares PAMPs de nature protéique pouvant être détectés par les PRRs de l'immunité innée de l'organisme hôte et donner lieu à la mise en place d'une série de mécanismes de défense immunitaire.

Bien que les données obtenues en modèle d'infection murin suggèrent que la flagelline de *Brucella melitensis* 16M pourrait être un PAMP, l'analyse bioinformatique de la séquence en acides aminés de celle-ci montre qu'elle s'apparenterait à un PAMP atypique (**Fig. 29**).

Tout d'abord, la séquence de la flagelline de *Brucella melitensis* 16M (282 acides aminés) est plus courte que celle des flagellines classiques abondamment décrites dans la littérature, comme celles de *Salmonella typhimurium* (495 résidus) ou de *Legionella pneumophila* (475 résidus). Comme l'illustre l'alignement de séquences de la **figure 29**, trois portions, correspondant à un total d'environ 200 résidus, sont absentes au centre de FlhC. Ainsi, la flagelline de *B. melitensis* 16M semble dépourvue des domaines globulaires D2 et D3.

De plus, comme décrit pour d'autres α -protéobactéries (Andersen-Nissen, Smith et al. 2005), l'analyse du domaine D1 de la flagelline de *Brucella* montre que les résidus requis pour la reconnaissance par le TLR5 ne sont pas conservés chez celle-ci (**Fig. 30**). En accord avec cette observation, il a été démontré que la flagelline de *Brucella melitensis* 16M n'était pas capable d'activer le TLR5 (Lapaque, Muller et al. 2009).

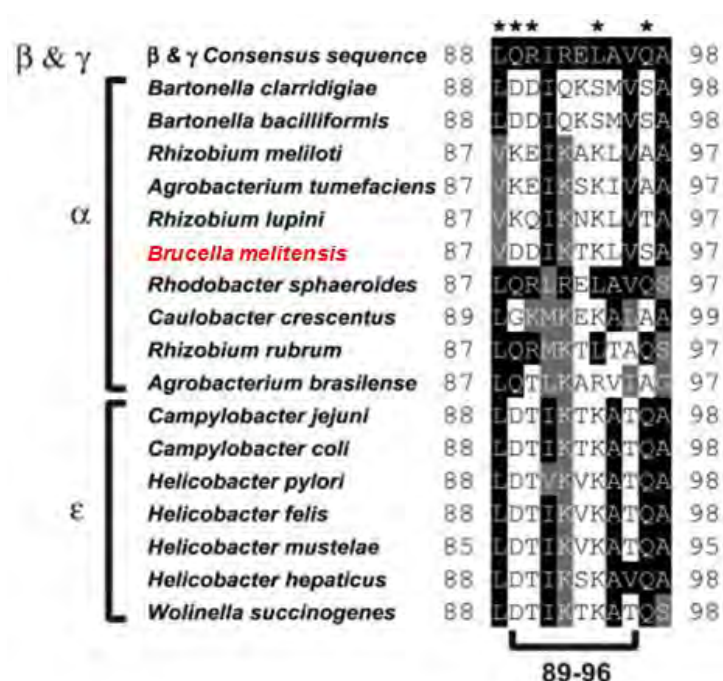


Figure 30 : La flagelline de *Brucella melitensis* 16M échappe à la détection par le TLR5 (adapté de Andersen-Niessen et al., 2005). Cette figure présente un alignement de séquence de la flagelline de bactéries appartenant à diverses sous-familles de protéobactéries. La séquence du dessus représente le consensus (résidus 88 à 98) décrit pour la flagelline des β - et les γ -protéobactéries impliqué dans l'activation du TLR5. Les astérisques indiquent les résidus importants pour la reconnaissance par le TLR5 ; ceux-ci ne sont pas conservés chez *B. melitensis*

Néanmoins, l'alignement de la séquence de la flagelline de *Brucella* à celle de *P. aeruginosa*, *L. pneumophila* et *S. typhimurium* montre qu'elle possède une région carboxy-terminale relativement bien conservée. Etant donné qu'il a été démontré que les 35 derniers acides aminés de cette région jouent un rôle important dans la reconnaissance de la flagelline par Naip5 (Lightfield, Persson et al. 2008), il se pourrait que la flagelline de *Brucella* puisse être détectée par ce PRR, si celle-ci se retrouve, à un moment donné, dans le cytosol d'une cellule infectée.

Cependant, l'analyse de la séquence de la région carboxy-terminale de la flagelline capable d'activer Ipaf (VLSLLR), mise en évidence au cours d'une récente étude (Miao, Mao et al. 2010), montre que celle de *Brucella melitensis* 16M présente une isoleucine en lieu et place de la valine² (ILSLFR). Or, la valine est décrite comme essentielle dans l'activation de Ipaf. De plus, on retrouve également une phénylalanine en lieu et place d'une leucine (ILSLFR)³. Il se pourrait donc que la flagelline de *B. melitensis* 16M ne puisse pas être reconnu par ce PRR.

² La valine et l'isoleucine sont tous deux des acides aminés aliphatiques hydrophobes. La valine possède une chaîne latérale composée de 3 atomes carbone, formant un groupe apolaire isopropyl. La chaîne latérale de l'isoleucine possède quant-à-elle 4 atomes de carbone ; cet acide aminé possède deux carbones asymétriques.

³ La leucine est un acide aminé aliphatique hydrophobe ; sa chaîne latérale est composée de 4 atomes de carbone dont 3 forment groupe apolaire isopropyl. La phénylalanine est un acide aminé aromatique dont la chaîne latérale comporte un noyau benzénique.

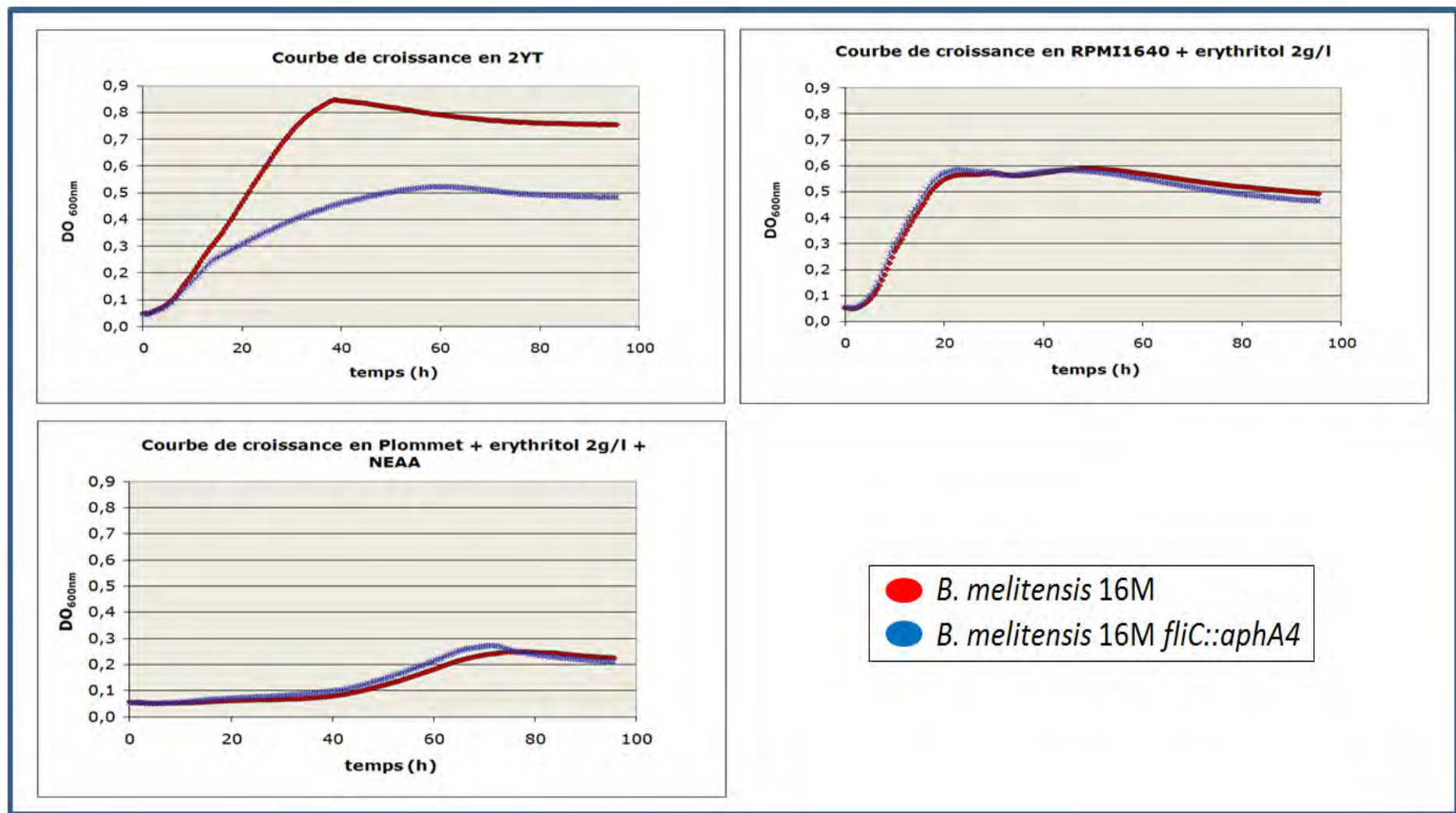


Figure 31. Comparaison des courbes de croissance de *B. melitensis* 16M et de *B. melitensis* 16M *fliC::aphA4* en milieux liquides. Le 2YT représente le milieu riche. Les milieux définis, RPMI1640 et Plommet, ont été supplémenté avec de l'érythritol (2g/l). Des acides aminés non essentiels ont également été ajoutés au milieu de Plommet.
(Résultat représentatif de deux expériences indépendantes ; Pour chacune des expériences, des triplicats ont été réalisés).

D. Caractérisation de la croissance *in vitro* de la souche *B. melitensis* 16M *fliC::aphA4*

Afin de déterminer si le phénotype hypervirulent du mutant *fliC::aphA4* observé en souris 3 semaines post-infection peut être lié à une meilleure capacité de réplication de celui-ci par rapport à la souche sauvage, un test de croissance *in vitro* a été réalisé. En effet, la non production de flagelline, et donc l'absence d'assemblage d'un filament, pourrait conférer un avantage à la souche *B. melitensis* 16M *fliC::aphA4*.

La croissance de ces deux souches a été testée dans trois milieux liquides différents en utilisant un Bioscreen (cfr. Matériel et méthodes) : le milieu riche 2YT et deux milieux définis, le RPMI1640 et le milieu de Plommet, tous deux supplémentés en érythritol (2g/l). Des acides aminés non essentiels ont également été ajoutés au milieu de Plommet. Il est probable que ce milieu se rapproche le plus des conditions physiologiques rencontrées par *Brucella* au cours de son processus infectieux dans un phagocyte (Kohler, Foulongne et al. 2002; Kohler, Michaux-Charachon et al. 2003).

Quel que soit le milieu considéré, le mutant *fliC::aphA4* ne possède pas un taux de croissance supérieur à celui de la souche sauvage. En effet, l'analyse des profils obtenus après culture en 2YT montre un meilleur taux de croissance de la souche *wild-type* par rapport au mutant *fliC::aphA4* (**Fig. 31**). En revanche, en milieux liquides définis, RPMI1640 et Plommet, les deux souches étudiées ont un profil de croissance semblable (**Fig. 31**).

Ensemble, ces données suggèrent que la virulence exacerbée de la souche *B. melitensis* 16M *fliC::aphA4* ne serait pas liée à une meilleure capacité de réplication par rapport à la souche sauvage de *B. melitensis* 16M.

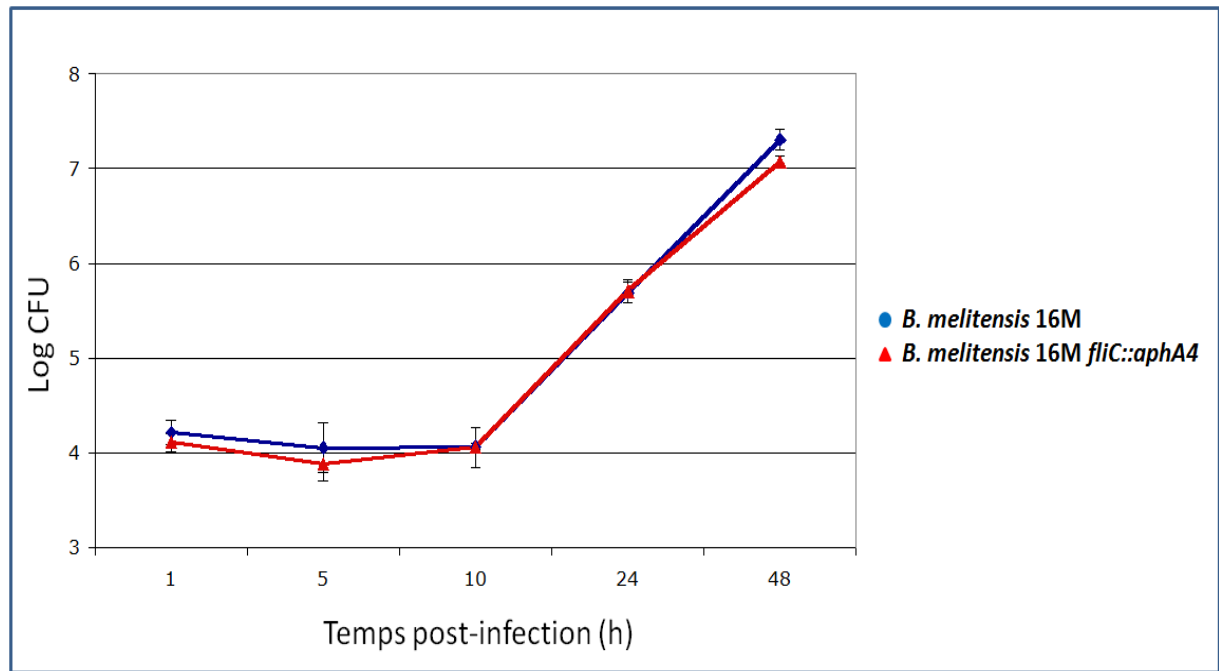


Fig. 32. Infection de macrophages murins RAW264.7 par la souche sauvage de *B. melitensis* 16M et le mutant *fliC::aphA4*. Le graphique présente la comparaison des logarithmes des CFUs intracellulaires, pour les souches sauvage et *fliC::aphA4* de *B. melitensis* 16M, en fonction du temps d'infection en macrophages murins. Aucune différence significative de CFU n'est observée pour le délétant par rapport à la souche *wild-type* de *B. melitensis* 16M pour chaque temps d'infection considéré. (Résultat représentatif de deux expériences indépendantes) (Les barres d'erreurs représentent des écarts-types calculés à partir de triplicats)

E. Caractérisation de la souche *B. melitensis* 16M *fliC::aphA4* en modèle d'infection cellulaire

1. Evaluation de la virulence de la souche *B. melitensis* 16M *fliC::aphA4* lors de l'infection de macrophages.

Comme décrit au cours de l'introduction de ce travail, la virulence de *Brucella* dépend de sa capacité à infecter et à se multiplier au sein des phagocytes professionnels et non-professionnels. Ainsi, nous avons voulu savoir si le mutant *fliC::aphA4* présentait un comportement différent de la souche sauvage de *B. melitensis* 16M lors de l'infection d'une lignée de macrophages murins. Les souches *wild-type* et mutante ont été déposées sur une monocouche de RAW264.7 à une dose infectante de 300 bactéries par cellule eucaryote. Des dilutions de la suspension bactérienne déposée sur les cellules ont été étalées sur 2YT agar et les CFUs comptées, après incubation, afin de contrôler la dose infectante. Après une heure d'incubation, au cours de laquelle les bactéries infectent les macrophages, un traitement à la gentamycine a été réalisé. Après 1, 5, 10, 24 et 48 heures d'incubation supplémentaires dans un milieu avec gentamycine, les macrophages ont été lysés et les CFUs intracellulaires ont été dénombrés par étalement de dilutions du lysat sur 2YT agar.

Le point réalisé 1 heure après l'infection permet d'estimer la capacité du mutant *fliC::aphA4* à envahir les macrophages par rapport à la souche sauvage. Les points 5 et 10 heures sont destinés à évaluer la survie et la capacité du délétant à atteindre sa niche de réplication tandis que les points 24 et 48 heures permettent d'estimer sa capacité à se répliquer dans les macrophages par rapport à la souche *wild-type*.

Comme l'illustre la **figure 32**, les capacités d'invasion, de survie, d'atteinte de la niche et de réplication de la souche *B. melitensis* 16M *fliC::aphA4* ne sont pas différentes par rapport à la souche sauvage.

Ainsi, l'absence de différence en ce qui concerne les CFUs aux différents temps d'infection testés suggère que la production de flagelline n'est pas essentielle à l'infection de macrophages murins.

Bien qu'aucune différence de virulence n'ait été observée lors de l'infection de macrophages murins par le mutant *fliC::aphA4*, par rapport à la souche *wild-type* de *B. melitensis* 16M, cela ne signifie pas qu'aucun phénotype ne puisse être observé dans ce modèle d'infection. Nous avons donc testé deux types de réponses du macrophage lors de l'infection par le mutant *fliC::aphA4*. Dans un premier temps, nous avons analysé son profil d'activation. Ensuite, nous avons voulu savoir si la flagelline pouvait être impliquée dans la cytotoxicité de *Brucella* décrite lors de l'infection de macrophages à haute dose infectante (Zhong, Wang et al. 2009).

2. Analyse du profil d'activation de macrophages infectés par la souche *B. melitensis* 16M *fliC::aphA4*

En plus de leur rôle de sentinelle et d'effecteur au cours de l'infection, les macrophages sont des médiateurs importants dans l'orientation de la réponse immunitaire adaptative. Ceux-ci forment un groupe de cellules hétérogène et peuvent notamment être distingués en fonction de leur profil d'activation. On retrouve ainsi notamment les

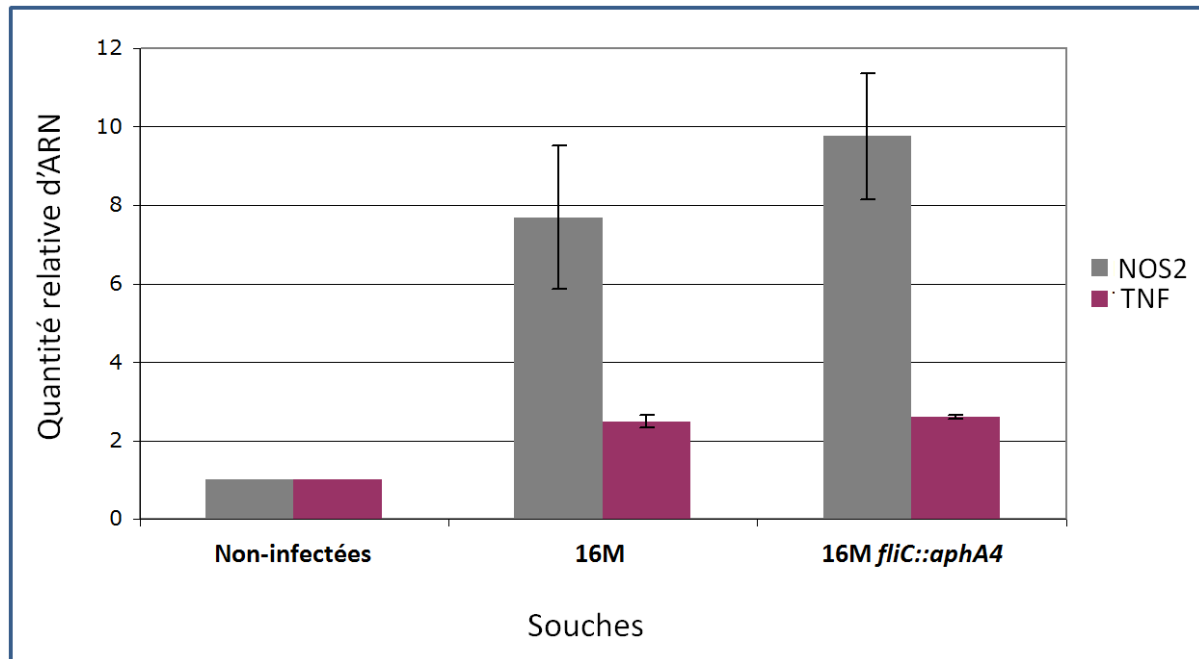


Figure 33. Analyse du profil d'activation de macrophages murins RAW264.7 infectés par les souches sauvage et *fliC::aphA4* de *B. melitensis* 16M. Le graphique présente la quantité relative des ARNs messagers NOS2 et TNF détectée après 24 heures d'infection des macrophages par la souche *wild-type* de *B. melitensis* 16M (16M) et la souche délétée pour *fliC* (16M *fliC::aphA4*). Des macrophages non-infectés sont utilisés comme contrôle. L'induction des gènes NOS2 et TNF témoigne de la polarisation M1 des macrophages au cours de l'infection par ces deux souches. Les macrophages infectés par ces deux souches ne présentent aucune différence significative en termes de quantité d'ARNm pour les deux cibles testées. (Les barres d'erreurs représentent des écarts-types calculés sur base de deux expériences indépendantes).

macrophages à polarisation M1 et les macrophages à polarisation M2 (Mosser 2003; Benoit, Desnues et al. 2008).

La polarisation M1 est aussi appelée ‘activation classique’. Dans ce cas, les macrophages sont activés par l’IFN- γ et par le TNF, dont la production est généralement TLR-dépendante. Cette activation se caractérise notamment par la production massive d’IL-12, de TNF, d’IL-6 ou encore d’IL-1 β . Les macrophages M1 produisent également du NO, à partir d’arginine via l’enzyme iNOS (*inducible Nitric Oxyde Synthase*), impliqué dans l’activité bactéricide du macrophage. Ce type de macrophages pro-inflammatoire est donc un important médiateur pour l’établissement d’une réponse immune de type T_H1, efficace contre des pathogènes intracellulaires.

Les macrophages M2 sont le produit d’une activation dite ‘alternative’ par l’IL-4. Leur activation n’entraîne pas la production de NO car elle est associée à l’induction du gène *arg1* codant pour une arginase. Les macrophages M2 produisent notamment de grandes quantités d’IL-10 et d’IL-1RA. Ainsi, à l’inverse des macrophages M1, ils sont associés à une réponse anti-inflammatoire et ils favorisent la réparation tissulaire.

Afin de déterminer si l’absence de flagelline chez le mutant *fliC::aphA4* peut modifier l’activation du macrophage par rapport à celle induite par la souche sauvage, le profil d’activation de RAW264.7, 24 heures après l’infection par les deux souches, a été analysé. Les bactéries ont été déposées sur une monocouche de macrophages murins RAW264.7 à une dose infectante de 300 bactéries par cellule eucaryote. Des dilutions des suspensions bactériennes déposées sur les cellules ont été étalées sur 2YT agar et les CFUs comptées, après incubation, afin de contrôler les doses infectantes. Après une incubation d’une heure, un traitement à la gentamycine, destiné à éliminer les bactéries extracellulaires, a été réalisé. Après 24 heures d’incubation supplémentaires, les macrophages ont été lysés au TriPure™ et leur ARN a été récupéré par extraction au chloroforme et précipitation à l’isopropanol (cfr. Matériel et méthodes). La pureté et la qualité des ARNs extraits ont été contrôlées (données non montrées) avant une étape de rétrotranscription utilisant des hexamères aléatoires comme primers. L’abondance de l’ARN messager de gènes cibles spécifiques de la réponse M1 (gènes NOS2 et TNF) et M2 (gènes ARG1, FIZZ1 et Ym1) du macrophage a été estimée par PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR) (cfr. Matériel et méthodes).

Les données obtenues à l’issue de la qRT-PCR (**Fig. 33**) montrent que les souches sauvage et *fliC::aphA4* de *B. melitensis* entraînent toutes deux une polarisation M1 des macrophages infectés. En effet, alors qu’aucune cible spécifique de la polarisation M2 n’a pu être amplifiée au cours de la qRT-PCR, les gènes NOS2 et TNF, spécifiques de la polarisation M1, sont bien induits chez ces macrophages. Par ailleurs, les résultats indiquent que le niveau d’expression des gènes NOS2 et TNF est semblable chez des macrophages infectés par la souche *wild-type* et par le mutant *fliC::aphA4* de *B. melitensis* 16M.

L’absence de différence en termes d’induction des gènes pro-inflammatoires NOS2 et TNF chez des macrophages infectés par les souches *wild-type* et *fliC::aphA4* de *B. melitensis* 16M suggère que la production de flagelline n’influence pas la polarisation de l’activation du macrophage au cours de l’infection *ex vivo*.

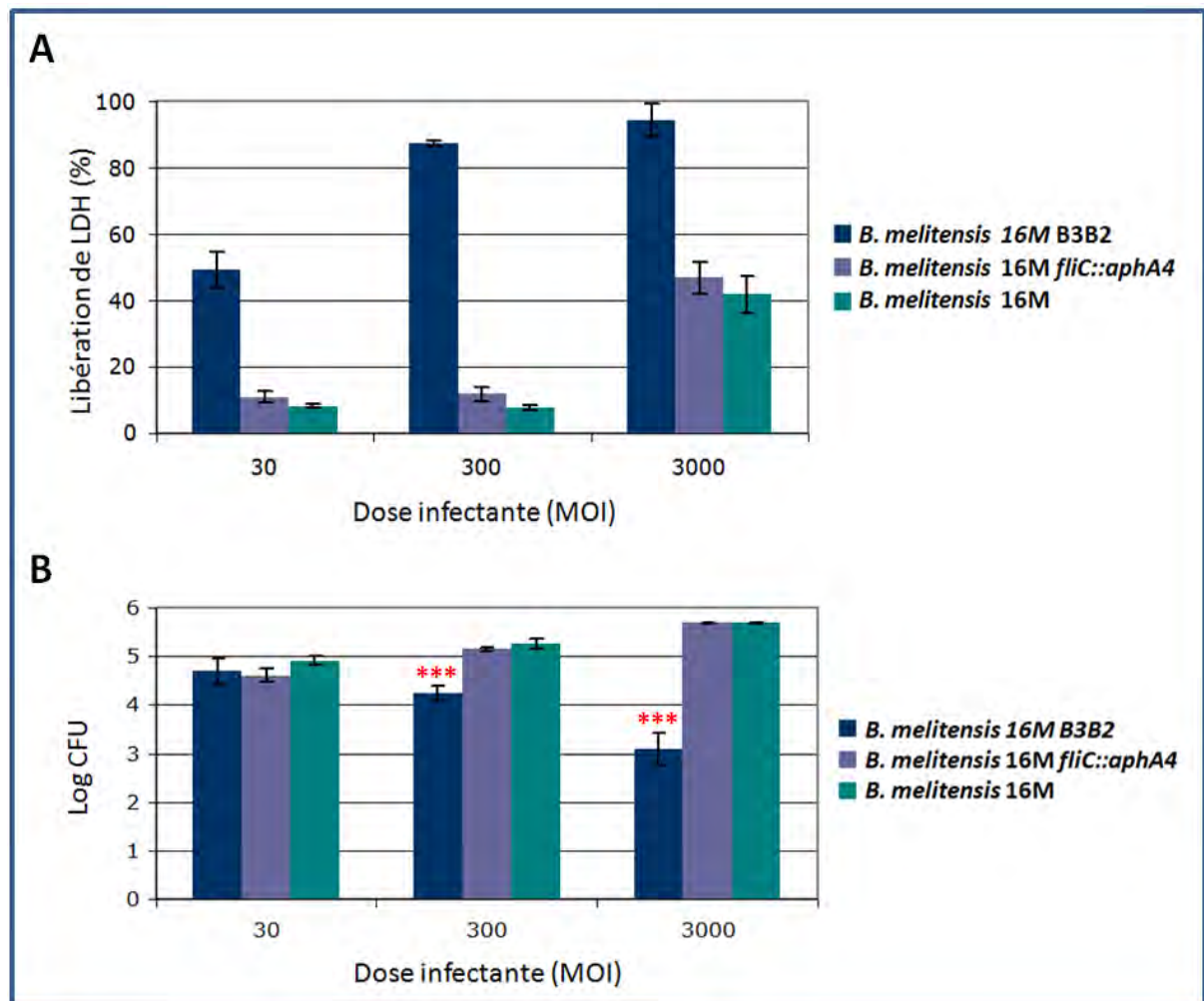


Figure 34. Test de la cytotoxicité de la souche *fliC::aphA4* de *B. melitensis* 16M. (A) Le graphique présente la comparaison de libération de LDH par des RAW264.7, 24 heures après l'infection par les souches sauvage et *fliC::aphA4* de *B. melitensis* 16M en fonction de la dose infectante (MOI). La souche *B. melitensis* 16M B3B2 est utilisée comme contrôle positif de cytotoxicité. Aucune différence significative n'est observée pour le délétant par rapport à la souche *wild-type* de *B. melitensis* et ce, pour l'ensemble des doses infectantes testées. (B) Le graphique présente la comparaison des logarithmes des CFUs intracellulaires lors de l'infection de RAW264.7 par les souches sauvage, B3B2 et *fliC::aphA4* de *B. melitensis* 16M, en fonction de la dose infectante (MOI). Aucune différence significative de CFU n'est observée pour le délétant *fliC::aphA4* par rapport à la souche *wild-type* de *B. melitensis* et ce, pour l'ensemble des doses infectantes testées. En revanche, le mutant B3B2 montre un phénotype en CFUs intracellulaires atténué à hautes doses infectantes (300 et 3000 MOI), reflétant son plus grand potentiel cytotoxique par rapport aux deux autres souches. (Résultat représentatif de deux expériences indépendantes ; les écarts-types ont été calculés à partir de triplicats).

3. Analyse de la cytotoxicité de la souche *B. melitensis* 16M *fliC::aphA4*

Etant donné que la flagelline de plusieurs bactéries pathogènes est capable de déclencher la pyroptose (cfr. **section B.4.3. de l'introduction**), via les inflammasomes Ipaf et Naip5, nous avons tenté de déterminer si le pouvoir cytotoxique de *Brucella*, décrit lors de l'infection de macrophages à haute dose infectante (Zhong, Wang et al. 2009), pouvait impliquer sa flagelline.

La cytotoxicité d'un agent chimique, physique ou biologique peut être estimée en quantifiant les dégâts engendrés au niveau de la membrane plasmique. La lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme cytosolique stable, retrouvée dans tous les types cellulaires, qui est rapidement libérée dans le milieu extracellulaire suite à la perte d'intégrité de la membrane plasmique.

Pour cette étude, la souche sauvage ainsi que les mutant *fliC::aphA4* et B3B2 de *B. melitensis* 16M ont été utilisés. Ce dernier est une souche rugueuse de *B. melitensis* 16M (Godfroid, Taminiau et al. 1998), incapable de produire de chaîne O, et est utilisé dans ce test comme contrôle positif de cytotoxicité. En effet, des souches rugueuses de *Brucella* ont été décrites comme plus cytotoxiques que les souches lisses. Les bactéries ont été déposées sur une monocouche de macrophages murins RAW264.7 à des doses infectantes de 30, 300 et 3000 bactéries par cellule eucaryote. Des dilutions des suspensions bactériennes déposées sur les cellules ont été étalées sur 2YT agar et les CFUs comptées, après incubation, afin de contrôler les doses infectantes. La phase d'invasion a duré 1 heure et un traitement à la gentamycine a été réalisé afin d'éliminer les bactéries extracellulaires. Après 24 heures d'incubation, les surnageants de culture ont été récupérés afin d'y doser la LDH (cfr. Matériel et méthodes). Les macrophages ont également été lysés et les CFUs intracellulaires ont été dénombrées par étalement de dilutions du lysat sur 2YT agar.

Comme le montre la **figure 34-A**, le délétant *fliC::aphA4* de *B. melitensis* 16M possède un pouvoir cytotoxique comparable à celui de la souche *wild-type* et ce, pour l'ensemble des doses infectantes testées. L'infection de macrophages par la souche rugueuse B3B2 de *B. melitensis* 16M montre un profil de libération de LDH d'une souche très cytotoxique lors d'infections *ex vivo*. De plus, au plus la dose infectante augmente au plus cette souche est cytotoxique.

Par ailleurs, l'analyse des CFU (**Fig. 34-B**) confirme qu'il n'y a pas de différence entre les souches sauvages et *fliC::aphA4* en ce qui concerne leur capacité de réplication intracellulaire et ce, quel que soit la dose infectante considérée. En revanche, les résultats montrent qu'au plus la dose infectante augmente au plus la souche B3B2 de *B. melitensis* est atténuée, en raison de sa plus grande cytotoxicité.

L'absence de différence en termes de libération de LDH pour les souches sauvage et *fliC::aphA4* aux différentes MOI testées suggère que la production de flagelline n'est pas liée à la capacité cytotoxique de *Brucella*, au moins en modèle d'infection de macrophages.

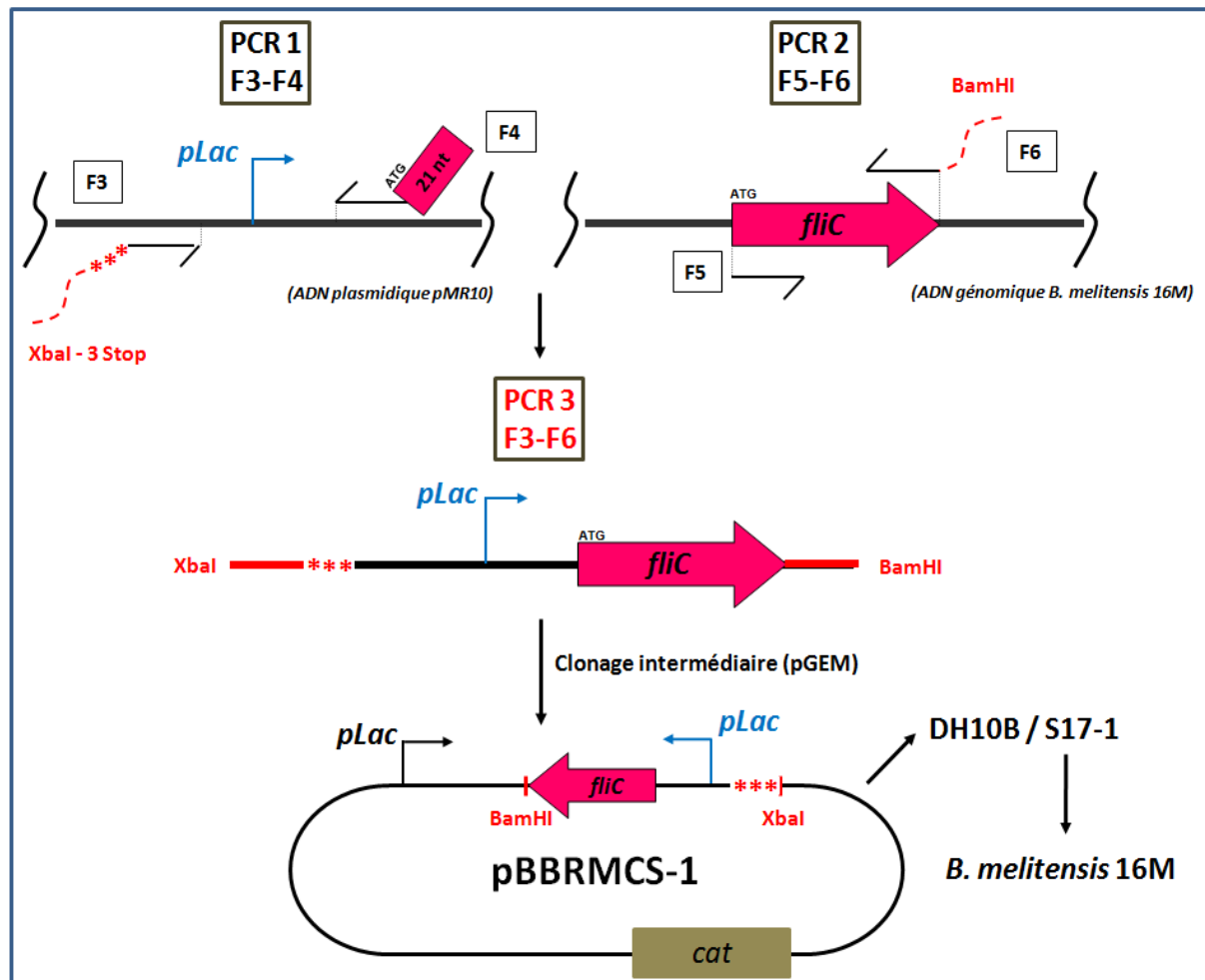


Figure 35. Représentation schématique de la stratégie adoptée pour la création d'un plasmide permettant l'expression constitutive de *fliC* par *Brucella melitensis* 16M. Un insert « *pLac-fliC* » a d'abord été généré par une PCR en 3 étapes. La première PCR (PCR1) permet d'amplifier le promoteur *pLac*. Le primer F3, s'hybridant en aval du *pLac*, possède une extrémité 5' présentant un site de restriction *XbaI* suivi d'un codon stop dans chaque phase de lecture. Le primer F4, qui s'hybride en aval du *pLac*, possède une séquence complémentaire aux 21 premiers nucléotides de l'ORF *fliC*. La deuxième PCR (PCR2), utilisant les primers F5 et F6, a permis d'amplifier l'ORF du gène *fliC*. L'oligonucléotide F6 présente en 5' un site de restriction *BamHI*. La PCR3 a, grâce aux primers F3 et F6, permis de coupler les amplicons des deux premières PCR. L'amplicon généré « *pLac-fliC* » a été cloné dans le plasmide intermédiaire 'pGEM' avant d'être cloné de manière directionnelle dans le vecteur 'pBBRMCS-1', en sens inverse du *pLac*.

F. Test de sécrétion *in vitro* de la flagelline de *B. melitensis* 16M

Au cours de leur cycle infectieux, *Salmonella typhimurium* et *Legionella pneumophila* sécrètent, respectivement de manière T3SS et T4SS – dépendante, leur flagelline dans le cytosol de la cellule hôte, où elle active l'inflammasome. (Miao, Andersen-Nissen et al. 2007).

La caractérisation de la souche *B. melitensis* 16M *fliC::aphA4* en modèle d'infection murin, ainsi qu'une analyse bioinformatique de la séquence en acides aminés de la flagelline de *B. melitensis* 16M, suggèrent qu'elle puisse être reconnue au moins par Naip5. Cependant, la condition *sine qua non* pour activer ces PRRs est l'atteinte du cytosol de la cellule infectée par la flagelline. Nous avons donc cherché à savoir si celle-ci pouvait être sécrétée par *Brucella*.

Pour répondre à cette question, nous avons testé la présence de la flagelline dans le surnageant de culture, en milieu défini de Plommet et en RPMI1640, d'une souche de *B. melitensis* 16M surexprimant *fliC*. En effet, comme cela a été décrit en milieu riche 2YT (Fretin, Fauconnier et al. 2005), la flagelline de *Brucella* n'est produite qu'en début de phase exponentielle en milieu défini de Plommet et en RPMI1640 (données non montrées). Un vecteur permettant l'expression constitutive de *fliC* a donc été construit.

1. Construction du plasmide de surexpression « *pBBRMCS-1 pLac-fliC* »

La séquence codante de *fliC* a été couplée au promoteur du gène de la β -galactosidase (*pLac*) par 3 PCRs successives (**Fig. 35**). Celui-ci présente une activité constitutive chez *Brucella in vitro* ainsi qu'au cours de l'infection cellulaire (O'Callaghan, Cazevieuille et al. 1999). Le produit PCR final a été cloné dans le plasmide intermédiaire pGEM avant d'être transféré dans le vecteur *pBBRMCS-1*. Ce dernier est un plasmide à large gamme d'hôte et à moyen nombre de copies chez *Brucella melitensis* 16M. Il possède une cassette de résistance au chloramphénicol (*cat*).

1.1. Amplification par PCR et génération de l'insert *pLac-fliC*

Les amorces nucléotidiques, F3 et F4 (cfr. Matériel et méthodes), destinées à amplifier le promoteur *pLac* (PCR1⁴) ont été définies de manière à ce que celui-ci soit flanqué en amont d'un codon stop dans chacune des phases de lecture et en aval d'une séquence complémentaire aux 21 premières paires de bases en 5' de la séquence codante *fliC*. Cette séquence de chevauchement permet de coupler directement, c'est-à-dire sans linker, le *pLac* et la séquence codante *fliC*. Celle-ci a par ailleurs été amplifiée (PCR2⁵) par le couple d'amorces F5 et F6 (cfr. Matériel et méthodes). Les codons *stop* utilisés et le couplage direct doivent permettre d'éviter la production de formes aberrantes de flagelline, à partir des signaux de régulation internes du *pBBRMCS-1*. Les produits des PCR1 et PCR2 ont été mis bout à bout avant que le fragment résultant de leur association, nommé *pLac-fliC*, ne soit

⁴ Le *pLac* a été amplifié en utilisant l'ADN plasmidique du pMR10 comme matrice.

⁵ La CDS de *fliC* a été amplifiée à partir d'une préparation d'ADN génomique de la souche *wild-type* de *Brucella melitensis* 16M.

amplifié par PCR (PCR3) à l'aide des amorces F3 et F6. Dans le but d'assurer le clonage directionnel du produit d'amplification final dans le pBBRMCS-1, des séquences correspondant aux sites de restriction XbaI et BamHI ont été respectivement ajoutées aux extrémités 5' des amorces F3 et F6. Les différents produits d'amplification obtenus ont tous été contrôlés par migration sur gel d'agarose (**Fig. 36-A**).

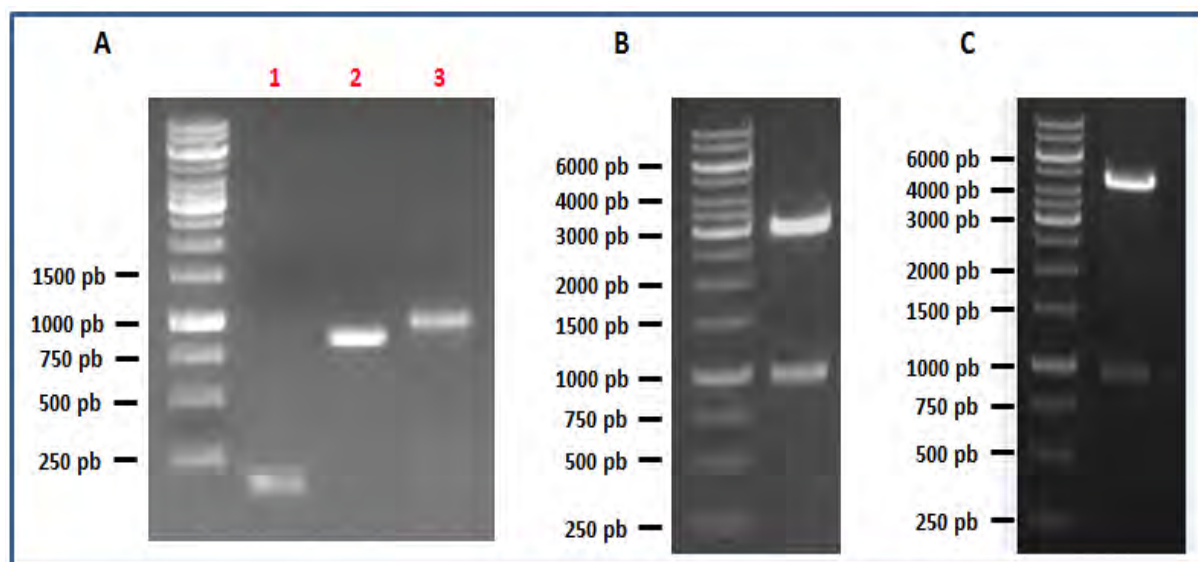


Figure 36. Résultats de l'électrophorèse en gel d'agarose des différents produits de restrictions enzymatiques réalisées dans le cadre de la construction du plasmide de surexpression « pBBRMCS-1 *pLac-fliC* ». (A) Visualisation des différents amplicons obtenus. 1. Amplicon « XbaI-*pLac* » de 159 paires de bases issu de la PCR1 (primers F3-F4). 2. Amplicon « *fliC*-BamHI » de 857 paires de bases généré par la PCR 2 (primers F5-F6). 3. Amplicon final « XbaI-*pLac-fliC*-BamHI » de 995 paires de bases obtenu à l'issue de la PCR3 (primers F3-F6). (B) Restriction diagnostique du produit de ligation pGEM *pLac-fliC* restreint par XbaI et BamHI ; les fragments attendus de respectivement 3025 et 985 paires de bases sont observés. (C) Restriction diagnostique du vecteur « pBBRMCS-1 *pLac-fliC* » restreint par BamHI et XbaI. Les fragments attendus, de respectivement 4695 et 985 paires de bases, sont observés.

1.2. Clonage de la séquence *pLac-fliC* dans le vecteur intermédiaire pGEM

L'amplicon « XbaI-*pLac-fliC*-BamHI », obtenu lors de la PCR3 a été purifié avant d'être cloné dans le vecteur intermédiaire pGEM, préalablement linéarisé par restriction EcoRV, celle-ci générant des bouts francs. Le produit de ligation a été transformé dans une souche DH10B d'*E. coli* CaCl₂ compétente, étalée par la suite sur milieu sélectif (LB solide – ampicilline) complémenté en X-gal et IPTG afin de réaliser un test blanc/bleu. L'ADN plasmidique de colonies blanches a été extrait par minipréparation et le vecteur récupéré, dénommé « pGEM *pLac-fliC* », a été validé par restriction diagnostique (**Fig. 36-B**) et l'insert séquencé.

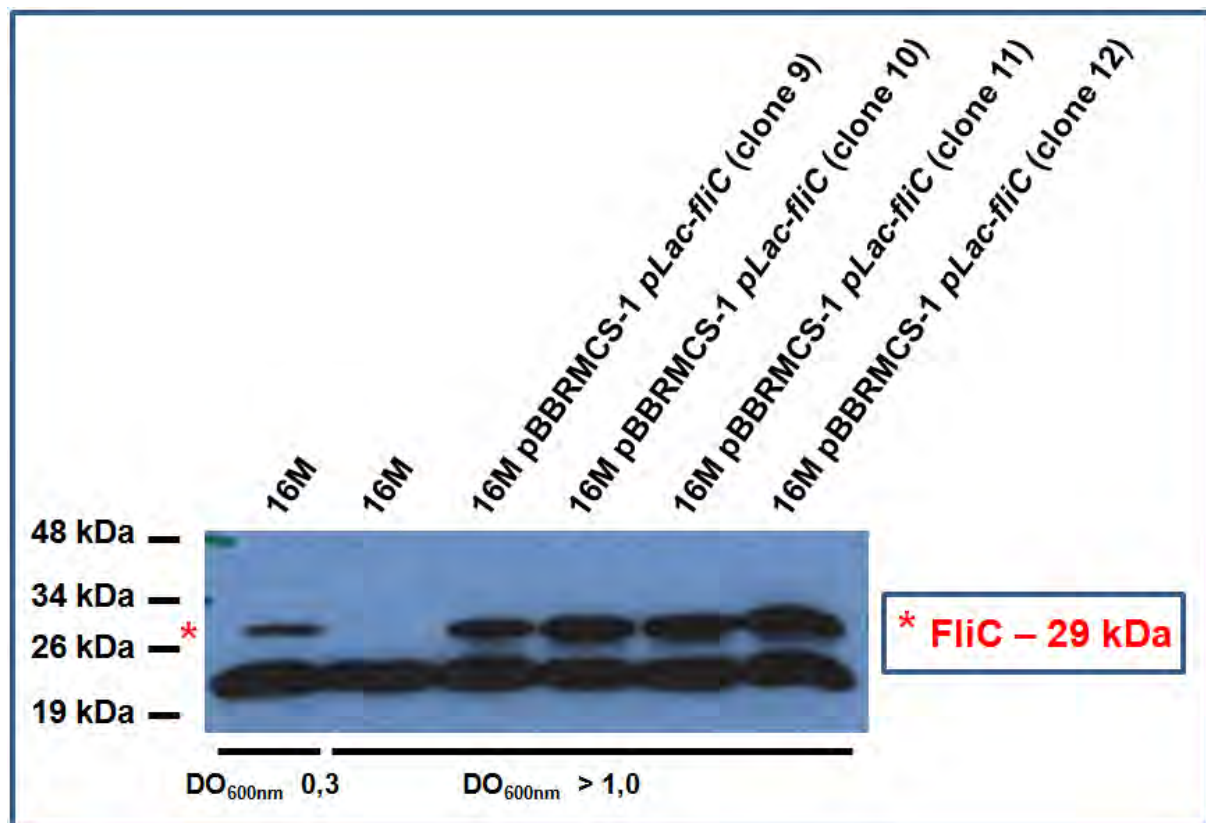


Figure 37. Profil de production de la flagelline à partir du vecteur « pBBRMCS-1 pLac-fliC » chez *Brucella melitensis* 16M. Des échantillons protéiques issus de 4 clones *Brucella melitensis* 16M pBBRMCS-1 pLac-fliC indépendants et de la souche *wild-type* de *Brucella melitensis* 16M à différentes phase de croissance en 2YT ont été obtenus. L'utilisation d'un anticorps polyclonal dirigé contre la flagelline montre que, contrairement à la souche sauvage, ces 4 clones sont capables de produire de la flagelline (29 kDa) à des DO_{600nm} supérieures à 1,0.

1.3. Clonage de l'amplicon *pLac-fliC* dans le pBBRMCS-1

L'insert « XbaI-*pLac-fliC*-BamHI » a été extrait du vecteur intermédiaire par une restriction XbaI/BamHI afin d'être cloné dans le pBBRMCS-1, restreint au préalable par ces mêmes enzymes. Une souche DH10B d'*E. coli* CaCl₂ compétente a été transformée par le produit de ligation et étalée sur milieu sélectif (LB solide – chloramphénicol) additionné de X-gal et d'IPTG pour réaliser un nouveau test blanc/bleu. Des colonies blanches ont été sélectionnées et leur ADN plasmidique, à savoir le « pBBRMCS-1 *pLac-fliC* », a été extrait par minipréparation afin de vérifier par restriction diagnostique le bon clonage de l'insert (**Fig. 36-C**).

2. Obtention de la souche *B. melitensis* 16M pBBRMCS-1 *pLac-fliC*

Une souche S17-1 d'*E. coli* CaCl₂ compétente a été transformée par le plasmide « pBBRMCS-1 *pLac-fliC* » afin que celui-ci puisse être transféré par conjugaison dans la souche *wild-type* de *B. melitensis* 16M. Plusieurs clones susceptibles de produire constitutivement la protéine FliC ont été sélectionnés.

3. Cinétique de production de flagelline *in vitro* par les souches de surexpression *B. melitensis* 16M pBBRMCS-1 *pLac-fliC*

Afin de valider les clones sélectionnés, la production de flagelline en fin de phase exponentielle de croissance a été testée. La souche *wild-type* de *B. melitensis* 16M a été utilisée comme contrôle. Des échantillons protéiques ont été préparés à différentes phases de croissance des différentes souches (cfr. matériels et méthodes) et un Western Blot a été réalisé (cfr. Matériel et méthodes). La présence de la flagelline a été révélée à l'aide d'un anticorps polyclonal de lapin, lui-même reconnu par des anticorps de chèvre anti-IgG de lapin couplés à la peroxydase.

Comme l'illustre la **figure 37**, les 4 clones de *B. melitensis* 16M pBBRMCS-1 *pLac-fliC* indépendants sélectionnés sont capables de produire de la flagelline en fin de phase exponentielle de croissance en milieu liquide riche (2YT), alors que la souche sauvage de *B. melitensis* 16M en est incapable.

Ces données démontrent que notre vecteur de surexpression « pBBRMCS-1 *pLac-fliC* » est fonctionnel dans la souche *B. melitensis* 16M, au moins en culture *in vitro*, puisqu'il permet la production constitutive de flagelline par *Brucella*.

4. Test de sécrétion *in vitro* de la flagelline chez *B. melitensis* 16M

Les souches *B. melitensis* 16M pBBRMCS-1 *pLac-fliC* et *B. melitensis* 16M pBBRMCS-1 (contrôle négatif) ont été mises en culture pendant 16 heures dans deux milieux liquides différents: le milieu RPMI1640 et le milieu de Plommet, tous deux supplémentés en érythritol (2g/l). Des acides aminés non essentiels ont également été ajoutés au milieu de Plommet.

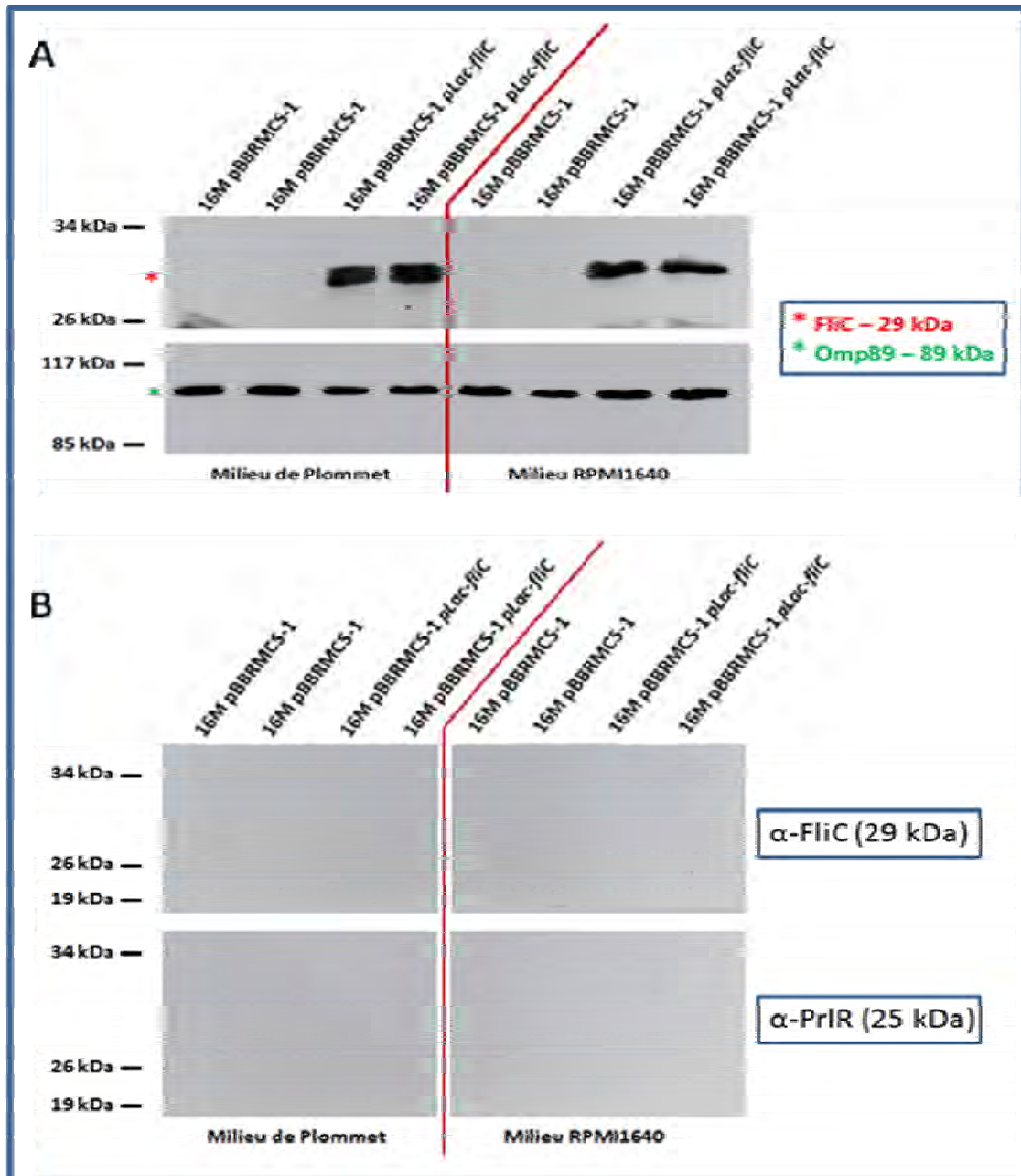


Figure 38. Etude *in vitro* de la sécrétion de la flagelline par la souche de surexpression *B. melitensis* 16M pBBRMCS-1 pLac-fliC. (A) Résultats du Western Blot anti-FliC et anti-Omp89 réalisé sur les extraits protéiques des culots de cultures de souches de *B. melitensis* 16M portant soit le pBBRMCS-1 vide soit le vecteur de surexpression de la flagelline pBBRMCS-1 pLac-fliC. L'expérience a été réalisée à partir de deux cultures indépendantes pour chacun des clones testés. Le résultat montre que notre souche de surexpression est fonctionnelle au cours de la croissance *in vitro* en milieux liquides définis car, à l'inverse de la souche *B. melitensis* 16M pBBRMCS-1, elle est capable de produire de la flagelline en fin de phase exponentielle dans les milieux RPMI1640 et Plommet. L'anticorps spécifique de l'Omp89 (89 kDa) a été utilisé comme contrôle de charge. (B) Résultats des Western Blot anti-PrIR et anti-FliC réalisés sur les protéines du surnageant de culture des souches utilisées en A. L'absence de signal détecté à la suite du Western anti-PrIR nous permet de contrôler l'absence de lyse bactérienne. Cependant, le Western Blot anti-FliC montre que la flagelline n'est pas sécrétée *in vitro* par *Brucella* dans les deux milieux définis testés.

Un Western Blot anti-flagelline (cfr. Matériel et méthodes), réalisés sur des échantillons protéiques préparés à partir des culots bactériens après centrifugation de la culture en fin de phase exponentielle de croissance, confirme la production de flagelline par la souche de surexpression (**Fig. 38-A**).

En parallèle, les surnageants de ces différentes cultures ont été filtrés et leurs protéines concentrées par précipitation avant de réaliser un Western Blot anti-PrlR et anti-flagelline (cfr. Matériel et méthodes). En effet, afin de s'assurer que l'éventuelle présence de flagelline dans les surnageants de cultures soit bien le résultat d'une sécrétion et non pas d'une lyse bactérienne en culture, nous avons tenté de détecter la présence de PrlR, un régulateur de réponse cytoplasmique de 25 kDa, dans les surnageants. Par ailleurs, une coloration au rouge Ponceau de la membrane de nitrocellulose après les étapes d'électrophorèse et de transfert a bien révélé la présence de protéines dans les différents surnageants de culture (données non montrées).

Comme le montre la **figure 38-B**, la protéine PrlR n'a été détectée dans aucun surnageant de cultures testés. Cependant, nous n'avons pu mettre en évidence la présence de flagelline dans le surnageant de culture de la souche *B. melitensis* 16M pBBRMCS-1 *pLac-fliC*, suggérant la non sécrétion de flagelline par *Brucella* (**Fig. 38-B**).

*Discussion
&
Perspectives*

Discussion et Perspectives

L'aptitude du système immunitaire à restreindre les capacités d'invasion, de survie, de multiplication et de dissémination d'un pathogène dépend premièrement de l'activation des récepteurs de l'immunité innée (PRRs), capables de reconnaître des motifs moléculaires hautement conservés et spécifiques de microorganismes (PAMPs) (Janeway and Medzhitov 2002).

Parmi ceux-ci, la flagelline, monomère du filament du flagelle bactérien, est un des rares PAMPs de nature protéique recensés à l'heure actuelle. Celle-ci peut être détectée dans les milieux extra- et intracellulaire, respectivement par des PRRs membranaire (TLR5) et cytosoliques (Ipaf et Naip5) dont le rôle au cours de l'infection par différents pathogènes est abondamment décrit dans la littérature (Miao, Andersen-Nissen et al. 2007). Alors que l'activation du TLR5 aboutit, via la voie de signalisation 'MyD88-dépendante', à l'expression de gènes pro-inflammatoires codant pour des cytokines ou des chémokines (Akira 2009), la reconnaissance de la flagelline par les NLRs Ipaf et Naip5 donne lieu à la formation de l'inflammasome, un complexe multiprotéique cytoplasmique nécessaire à l'activation de la caspase-1 (Delbridge and O'Riordan 2007). Celle-ci est notamment responsable d'une forme de mort cellulaire nommée 'pyroptose', se démarquant de la nécrose ou de l'apoptose (Bergsbaken, Fink et al. 2009), qui est entre autres impliquée dans le contrôle d'infections causées par *L. pneumophila*, *S. typhimurium* ou encore *P. aeruginosa* (Martinon, Mayor et al. 2009).

Brucella melitensis 16M est une bactérie Gram-négative pathogène intracellulaire de phagocytes professionnels et non-professionnels de l'hôte (Guerra 2007). Bien que la nature et la sévérité de la maladie occasionnée apparaissent relativement variables chez ce dernier, l'infection causée par *Brucella* est caractérisée par sa propension à atteindre un statut chronique. À cette fin, ce pathogène dispose d'une série de facteurs de virulence diversifiés dont les mécanismes d'action sont à l'heure actuelle plus ou moins compris, et qui lui permettent de persister au sein de sa cellule hôte pendant une période prolongée, en participant à la manipulation du trafic intracellulaire de la BCV (Roop, Gaines et al. 2009) ainsi qu'à la modulation de l'activation du système immunitaire de l'hôte (Barquero-Calvo, Chaves-Olarte et al. 2007).

Depuis la mise en évidence du système flagellaire de *B. melitensis* 16M, plusieurs études lui ont attribué un rôle prépondérant dans le déroulement de son cycle infectieux *in vivo*. En effet, la virulence d'un mutant portant un transposon dans le gène *flgF*, codant pour une protéine basale du flagelle, est atténuée par rapport à la souche *wild-type* après 21 jours d'infection en modèle caprin (Zygmunt, Hagius et al. 2006). De plus, Fretin et al. ont également montré que des souches de *B. melitensis* 16M mutées via un plasmide intégratif pour des gènes flagellaires codant pour d'autres protéines du flagelle (*flhA*, *motB*, *fliF*, *flgI*, *flgE* et *fliC*) avaient toutes un profil de virulence atténué après 4 semaines d'infection en modèle murin (Fretin, Fauconnier et al. 2005). Ainsi, cet appendice serait nécessaire à la persistance à long terme de *Brucella* au sein de son hôte. Cependant, le rôle de la flagelline de *B. melitensis* 16M (FliC) au cours de l'infection est controversé. En effet, une souche de *B. melitensis* 16M délétée pour le gène *fliC* obtenue par remplacement allélique présenterait un phénotype différent des mutants des autres gènes flagellaires (Fretin, Fauconnier et al. 2005),

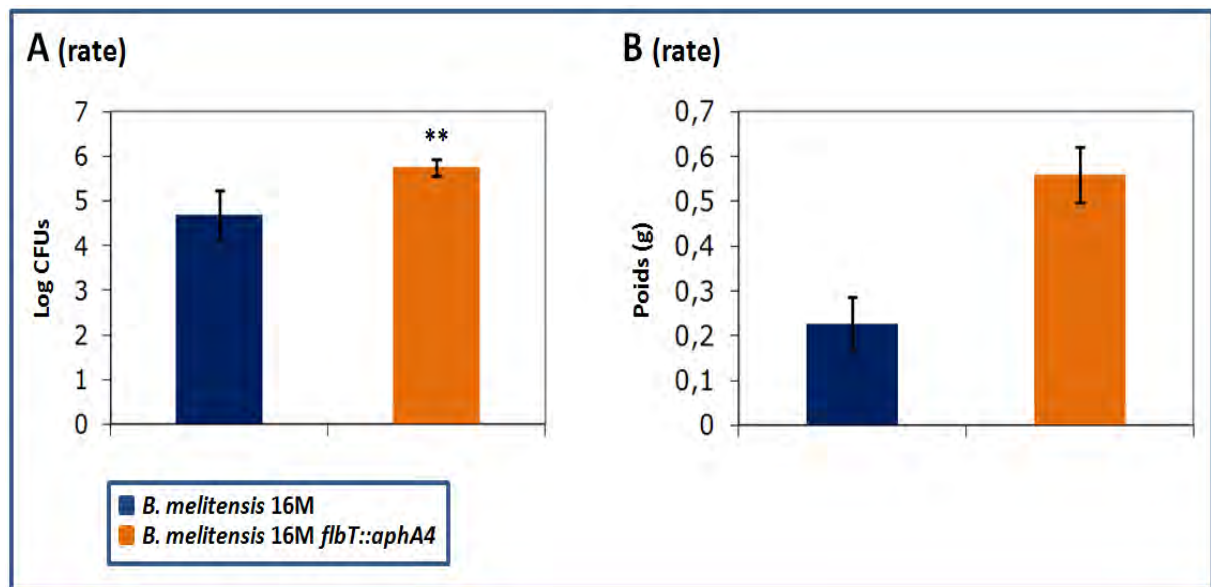


Figure 39. Comparaison de la virulence de la souche sauvage de *B. melitensis* 16M et du mutant *flbT::aphA4* après 28 jours d'infection en souris BALB/c. Le graphique **A** exprime la virulence des différentes souches en logarithmes du nombre de CFUs par rate. La charge bactérienne est significativement plus élevée ($P < 0,01$) dans le cas de l'infection causée par le mutant *flbT::aphA4* après 4 semaines d'infection. Le graphique **B** exprime l'évolution du poids moyen de la rate de la souris au cours de l'infection. Les souris infectées par la souche *flbT::aphA4* de *B. melitensis* 16M présente une splénomégalie plus importante par rapport à la souche *wild-type* après 28 jours d'infection. (Résultat représentatif d'une expérience) (Les barres d'erreurs représentent des écarts-types calculés sur des groupes de 6 souris. Test statistique: ANOVA 1)

puisque une virulence exacerbée a été observée 4 semaines post-infection en modèle d'infection murin (J. Ferrooz, données non publiées).

- **Une souche de *B. melitensis* 16M ne produisant pas de flagelline présente une virulence exacerbée en modèle d'infection murin**

L'infection de souris BALB/c par la souche *fliC::aphA4* de *B. melitensis* 16M construite au laboratoire (J. Ferrooz, données non publiées), nous a permis de confirmer sa virulence exacerbée à des temps tardifs d'infection. En effet, contrairement aux résultats décrits pour le mutant *fliC* intégratif utilisé par Fretin et al. (atténuation du mutant 4 semaine post-infection), nous avons montré que le mutant *fliC::aphA4*, obtenu par remplacement allélique, présente bel et bien une hypervirulence caractérisée par une charge bactérienne plus importante dans la rate et le foie de souris BALB/c par rapport à la souche *wild-type* à partir de 3 semaines post-infection.

Par ailleurs, on a pu mettre en évidence que les souris infectées par la souche *fliC::aphA4* présentent une hépatosplénomégalie significativement plus importante que lors de l'infection causée par la souche sauvage puisque leur rate et leur foie apparaissent à la fois plus larges et plus lourds à partir de 3 semaines post-infection. De plus, cette splénomégalie est associée à une déstructuration de la pulpe rouge et de la pulpe blanche typique d'une importante réaction inflammatoire (Enright, Araya et al. 1990). Cette désorganisation tissulaire se caractérise notamment par une perte majeure d'intégrité au niveau de la pulpe rouge associée à un profil œdémateux ainsi que par la déstructuration des follicules lymphoïdes.

Il semblerait donc que le phénotype décrit par Fretin et al. pour le mutant *fliC* soit le résultat d'un effet polaire associé à l'intégration du plasmide. En effet, celui-ci a vraisemblablement altéré l'expression des gènes de l'opéron *fliF* situé en aval du gène *fliC* (*fliC* est à 85 paires de bases de l'ATG de l'ORF *fliF*). Ceci expliquerait la virulence atténuée en modèle d'infection murin décrite à la fois pour les mutants intégratifs *fliC* et *fliF*.

L'utilisation d'un plasmide destiné à apporter en *trans* une copie de *fliC*, ainsi que l'ensemble de ses séquences de régulation, dans le mutant *fliC::aphA4* n'a pu compléter le phénotype de cette souche en modèle d'infection murin. Etant donné que les bactéries récupérées dans la rate et dans le foie après 4 semaines d'infection sont toujours capables de pousser de manière comparable sur des milieux solides 2YT sélectif (chloramphénicol) et non sélectif (données non montrées), nous avons écarté la possibilité que le plasmide de complémentarité ait été perdu pour cause d'instabilité lors de l'infection. Il semblerait donc que l'absence de complémentarité soit directement liée à un problème de production effective de la flagelline en souris, comme le suggère la production en plus faible quantité *in vitro* (Fig. 27). Par ailleurs, afin d'outrepasser tout problème potentiellement lié à l'utilisation du vecteur pMR10cat, il serait intéressant d'envisager une approche de complémentarité permettant de rapporter (*knock-in*) le gène *fliC*, ainsi que ses séquences de régulation, directement au locus du gène *fliC* muté chez la souche *fliC::aphA4*.

Néanmoins, on a pu montrer que le mutant *flbT::aphA4* présente une virulence, une splénomégalie et un profil inflammatoire splénique semblables au mutant *fliC::aphA4* 4 semaines post-infection en modèle murin (Fig. 39 et données non montrées). Pour rappel, le gène *flbT* code pour un régulateur post-transcriptionnel spécifique de *fliC* et une souche de

Brucella délétée pour *flbT* est incapable de produire de la flagelline *in vitro*, même si le promoteur du gène codant celle-ci est toujours actif (J. Ferroz, données non publiées).

Ainsi, une souche de *Brucella* incapable de produire sa flagelline semble se maintenir plus longtemps au cours de l'infection et est moins vite éliminée que la souche *wild-type*. Il s'agit ici, à notre connaissance, du second cas¹ de mutant de *B. melitensis* 16M présentant un profil de virulence exacerbé en modèle d'infection murin.

Un exemple d'hypervirulence, similaire à celui présenté au cours de cette étude, est décrit pour une souche de *Pseudomonas* dépourvue de flagelline lors de l'infection d'*Arabidopsis thaliana* (Li, Lin et al. 2005). La flagelline de *Pseudomonas* phytopathogènes est connue pour activer le système immunitaire inné des plantes. Chez *Arabidopsis*, un peptide amino-terminal de ce PAMP est reconnu par le récepteur FLS2 (FLagellin Sensitive receptor 2) et active la cascade des MAP kinases, permettant d'induire l'expression de gènes codant pour des protéines de défense afin de lutter contre le pathogène (Gomez-Gomez and Boller 2000). Une souche sauvage de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, produisant de la flagelline, inoculée à un plant d'*Arabidopsis* active rapidement les systèmes de défense via le FLS2 et ne cause aucun dégât tissulaire chez celui-ci. En revanche, une plante inoculée par une souche *fliC*^{-/-} présente un profil infectieux sévère avec une croissance importante des bactéries au niveau de ses feuilles et des atteintes tissulaires importantes (Li, Lin et al. 2005).

Par ailleurs, Vijay-Kumar et al. ont également décrit un cas de virulence exacerbée en modèle d'infection murin pour un mutant aflagellé de *S. typhimurium* incapable de produire de la flagelline (Vijay-Kumar, Wu et al. 2006). En effet, ils ont décrit que ce mutant aflagellé, en plus de ne provoquer qu'une réponse inflammatoire restreinte au niveau de l'intestin en phase aigue de salmonellose, est hypervirulent à des temps tardifs d'infection et entraîne une déstructuration importante des tissus intestinaux. Par ailleurs, ils ont également montré que l'administration systémique chez la souris de monomères de flagelline purifiés 2 heures avant l'infection par le mutant aflagellé permettait de diminuer le nombre de bactéries ainsi que l'inflammation exacerbée au niveau des muqueuses intestinales.

• La flagelline de *B. melitensis* 16M, un PAMP ?

L'ensemble de nos observations nous permet de proposer que la flagelline de *Brucella* soit un PAMP. En effet, l'absence de cette protéine au cours de l'infection semble altérer les capacités de l'hôte à mettre en place une réponse immunitaire efficace pour lutter contre *Brucella*.

Cependant, en tenant compte de ce qui est connu à propos de la reconnaissance de la flagelline par le système immunitaire inné, l'analyse bioinformatique réalisée sur la flagelline de *B. melitensis* 16M montre que celle-ci est atypique.

En plus d'être plus courte que les flagellines classiques décrites dans la littérature comme celles de *S. typhimurium* ou *L. pneumophila*, la flagelline de *B. melitensis* 16M ne possède pas la séquence consensus requise pour l'activation du TLR5 (Andersen-Nissen,

¹ Une souche de *B. melitensis* 16M mutée pour le gène *aiiD* a également été décrite comme hypervirulente à des temps tardifs d'infection en modèle murin. Ce gène code pour une acylase capable de dégrader des AHLs (*Acyl-Homosérine Lactone*), molécules signaux du système de régulation appelé 'Quorum Sensing'.

Smith et al. 2005). En accord avec cette observation, il a été démontré que la flagelline de *Brucella* était incapable d'activer ce PRR (Lapaque, Muller et al. 2009).

L'analyse de la séquence de la région carboxy-terminale de la flagelline capable d'activer Ipaf (VLSLLR), mise en évidence récemment par Miao et al., montre que celle de *Brucella melitensis* 16M possède une phénylalanine et une isoleucine respectivement en lieu et place d'une leucine et d'une valine. Cette dernière étant essentielle pour l'activation de Ipaf (Miao, Mao et al.), il se pourrait que la flagelline de *B. melitensis* 16M ne puisse pas être reconnu par ce PRR.

Néanmoins, la région carboxy-terminale de FliC importante pour la reconnaissance par Naip5 (Lightfield, Persson et al. 2008) est relativement bien conservée chez *Brucella*.

Dès lors, bien que la flagelline de *Brucella* apparaisse comme non-conventionnelle et soit incapable d'activer le TLR5, il se pourrait que celle-ci soit un PAMP détecté dans le cytosol de la cellule hôte au moins par le NLR Naip5.

• La flagelline de *B. melitensis* 16M n'activerait pas l'inflammasome

De nombreuses données dans la littérature montrent que la flagelline de *S. typhimurium*, *L. pneumophila* ou *P. aeruginosa*, est capable de déclencher la mort cellulaire par pyroptose via les inflammasomes Ipaf et Naip5, celle-ci pouvant être suivie par une mesure de la libération de LDH dans le milieu extracellulaire (Molofsky, Byrne et al. 2006; Franchi, Stoolman et al. 2007; Sun, Rolan et al. 2007). Par ailleurs, *B. melitensis* 16M possède un pouvoir cytotoxique lors de l'infection de macrophages à haute dose infectante (Zhong, Wang et al. 2009).

L'absence de différence en termes de cytotoxicité entre les souches *wild-type* et *fliC::aphA4* aux différentes MOIs testées au cours de cette étude suggère que la production de flagelline n'est pas liée à la capacité cytotoxique de *B. melitensis* 16M, au moins en modèle d'infection de macrophages.

Si la flagelline de *Brucella* était capable d'activer l'inflammasome, il aurait été cohérent que la souche *fliC::aphA4* soit associée à une libération de LDH inférieure à celle de la souche sauvage en modèle d'infection de macrophages.

Afin d'être reconnue par Ipaf ou Naip5 et d'activer l'inflammasome, la flagelline doit être transloquée dans le cytosol de la cellule hôte. Chez *Salmonella typhimurium* et *Legionella pneumophila*, cette sécrétion se réalise respectivement de manière T3SS et T4SS – dépendante (Miao, Andersen-Nissen et al. 2007).

Le Western Blot réalisé sur les protéines précipitées du surnageant de culture de la souche de surexpression *B. melitensis* 16M pBBRMCS-1 *pLac-fliC*, produisant la flagelline de manière constitutive, n'a cependant pas pu mettre en évidence cette dernière. Les données exposées dans ce travail sont les seules qui nous aient été permis d'interpréter car, à l'inverse de trois autres tests de sécrétion indépendants, aucune lyse bactérienne n'a été mise en évidence.

À ce jour, RicA est l'unique protéine caractérisée au laboratoire comme pouvant être sécrétée par *Brucella* (Jamet, Filopon et al., en préparation). Celle-ci serait donc un excellent contrôle positif pour ce test. Cependant aucun anticorps capable de reconnaître spécifiquement cette protéine n'est disponible à l'heure actuelle.

Cela dit, le fait que nous n'ayons pu mettre en évidence de sécrétion de flagelline dans le surnageant de culture *in vitro* d'une souche de *Brucella* ne signifie en aucun cas que ce pathogène ne puisse sécréter cette protéine au cours du processus infectieux.

Néanmoins, l'absence de différence en termes de cytotoxicité entre les souches sauvage et *fliC::aphA4* de *B. melitensis* 16M lors de l'infection de macrophages à hautes doses infectantes et l'incapacité de *Brucella* à sécréter sa flagelline *in vitro* suggèrent que ce pathogène ne soit pas capable d'activer l'inflammasome par l'intermédiaire de ce PAMP putatif. Afin de confirmer cette piste, il serait intéressant d'évaluer par Western Blot si l'infection de macrophages par la souche sauvage de *B. melitensis* 16M est associée ou non à la maturation de la pro-caspase-1 en caspase-1 (M. Terwagne, thèse en cours). Bien que l'activation de la caspase-1 ne soit pas un processus exclusif à la reconnaissance cytosolique de la flagelline² (Yu and Finlay 2008), les données obtenues à l'issue de ce test permettraient de définir si *Brucella* est capable d'activer ou non un inflammasome au cours de l'infection.

- **L'absence de flagelline déclencherait-elle une réponse immunitaire biaisée chez l'hôte murin lors de l'infection ?**

Au cours du processus infectieux de la souche sauvage de *B. melitensis* 16M chez l'hôte murin, le pic de répllication du pathogène est atteint 5 jours après le début de l'infection. La diminution du nombre de CFUs observée au-delà de ce cinquième jour dans la rate et dans le foie résulte du développement d'une réponse adaptative par le système immunitaire.

Comme l'illustrent le profil de virulence de la souche *fliC::aphA4* de *B. melitensis* 16M en modèle d'infection murin ainsi que le profil inflammatoire important décrit dans la rate à des temps tardifs d'infection, il semblerait que l'absence de la flagelline au cours de l'infection donne lieu à la mise en place d'une réponse immune biaisée et inefficace.

Compte tenu du rôle central joué par les macrophages dans la détection des pathogènes, dans l'activation des premiers mécanismes de défense et dans l'orientation de la réponse adaptative lors de l'infection, nous avons voulu savoir si l'absence de flagelline chez le mutant *fliC::aphA4* pouvait modifier l'activation du macrophage par rapport à celle induite par la souche sauvage.

Les résultats montrent que les souches sauvage et *fliC::aphA4* de *B. melitensis* 16M entraînent toutes deux une polarisation M1 des macrophages infectés, associée à des niveaux d'expression des gènes NOS2 et TNF comparables.

Néanmoins, seule l'expression de 2 gènes spécifiques de la polarisation M1 et de 3 gènes spécifiques de la polarisation M2 de macrophages a été analysée par qRT-PCR au cours de ce travail. Un profil d'activation plus détaillé de macrophages infectés par la souche *fliC::aphA4* de *B. melitensis* 16M se focalisant sur l'expression de plusieurs gènes associés à l'inflammation est en cours (M. Terwagne, thèse en cours). Ainsi, la mise en évidence de la variation d'expression d'un ou plusieurs gène(s) spécifique(s) de l'activation du macrophage pourrait ouvrir des pistes susceptibles d'expliquer, du moins en partie, les causes du développement d'une réponse immunitaire biaisée décrite par la souris.

² La caspase-1 peut être activée par différents types d'inflammasomes, notamment suite à la reconnaissance de LPS, de DAMPs ou de muramyl dipeptide.

Par ailleurs, une étude réalisée par Commander et al., visant à identifier des gènes de *B. melitensis* 16M susceptibles d'être utilisés pour l'élaboration d'un vaccin à ADN nu, a montré que l'inoculation à des souris d'un plasmide portant le gène *fliC* 30 jours avant l'infection par la souche *wild-type* est capable, contrairement aux autres vaccins 'candidats', de favoriser la survie et la réplication de celle-ci (Commander, Spencer et al. 2007). Les données exposées dans cette étude suggèrent ainsi que l'interaction de la flagelline de *B. melitensis* 16M avec le système immunitaire est prépondérante dans le contrôle de l'infection chez l'hôte murin.

Afin de comprendre le rôle joué par la flagelline de *B. melitensis* 16M au cours de l'infection, il serait intéressant de poursuivre la caractérisation de la réponse immunitaire biaisée développée par la souris lors de l'infection par le mutant *fliC::aphA4*.

En effet, étant donné que le dialogue entre le pathogène et le système immunitaire en début d'infection est prépondérant dans le conditionnement de la réponse immune chez l'hôte, il serait propice de décrire ce cross-talk à des temps plus précoces d'infection. Nous pourrions ainsi caractériser l'infection causée par les souches sauvage et *fliC::aphA4* de *B. melitensis* 16M sur base de leur capacité à déclencher une réponse inflammatoire (identification des cytokines/chémokines produites, infiltration de polymorphonucléaires,...) , à altérer les tissus et à se disséminer dans l'organisme au début de l'infection.

En perspective, il serait également intéressant de décrire davantage la réponse inflammatoire observée à des temps tardifs d'infection en souris. Pour ce faire, nous pourrions réaliser une description détaillée des populations de cellules spléniques, en termes de types cellulaires et de localisation, à l'aide de différents marquages permettant une étude par immuno-histo-fluorescence.

• *B. melitensis* 16M produit-elle de la flagelline lors de l'infection de macrophages ?

L'absence de phénotype cellulaire du mutant *fliC::aphA4* identifié lors de l'infection de cellules au cours de cette étude pourrait être liée à la non production de flagelline par *Brucella* dans ces conditions.

Pour rappel, outre l'absence de différence de cytotoxicité des souches utilisées et d'activation des macrophages infectés, nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence de virulence entre les souches *wild-type* et *fliC::aphA4* de *B. melitensis* 16M lors de l'infection de macrophages murins RAW 264.7 à une MOI de 300. L'expérience a également été réalisée à l'aide de différentes doses infectantes de macrophages RAW 264.7 (MOI 30 et 3000) ainsi que lors de l'infection de cellules HeLa, et a donné des résultats comparables au précédent test (données non montrées).

Ainsi, les données récoltées à l'issue des tests de virulence, de cytotoxicité et d'activation de macrophages nous amènent à proposer que la flagelline de *B. melitensis* 16M pourrait très bien ne pas être produite en modèle d'infection cellulaire. Jusqu'à présent, parmi l'ensemble des gènes flagellaires de *Brucella*, seuls les promoteurs des gènes *fliF* (Fretin, Fauconnier et al. 2005) et *flgE* (L. Schiavolin, données non publiées) ont été décrits comme activés lors de l'infection de cellules HeLa ou de macrophages bovins. Mis à part nos connaissances sur la régulation de la production de la flagelline de *Brucella* au cours d'une croissance en milieu liquide riche 2YT, aucune donnée ne nous permet à l'heure actuelle de savoir si celle-ci est bien produite lors d'infection *ex vivo*. Le test d'une souche de *B. melitensis* 16M portant un plasmide munis du promoteur du gène *fliC* fusionné au gène *gfp* en infection de cellules est en cours (M. Terwagne, thèse en cours). Cependant, étant donné que

l'expression du gène *fliC* est également régulée au niveau post-transcriptionnel par les régulateurs FlbT et FlaF, il serait plus adéquat d'évaluer directement la production de la flagelline en modèle d'infection cellulaire. Pour ce faire, on pourrait par exemple fusionner la flagelline à un tag carboxy-terminal fluorescent.

Matériel
&
Méthodes

Matériel et Méthodes

A. Souches bactériennes, souris, plasmides et cellules

1. *Souches bactériennes*

***Escherichia coli* DH10B** : Cette souche a été utilisée afin d'amplifier divers plasmides. Ces derniers sont au préalable introduits dans la bactérie par transformation (électroporation ou transformation CaCl₂).

Génotype : F⁻ *endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL ΔlacX74 Φ80lacZΔM15 araD139 Δ(ara,leu)7697 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) λ-* (Invitrogen Life-Technologies)

***Escherichia coli* S17-λpir** : Cette souche, grâce au plasmide RP4 intégré dans son génome, est utilisée afin de transférer par conjugaison un plasmide muni d'une origine de transfert. Elle est par ailleurs résistante à la spectinomycine, à la streptomycine ainsi qu'au triméthoprime.

Génotype : *recA thi pro hsd* (rm+) RP4::2-Tc::Mu::Km Tn7 lysogenized with λpir phage (Miller and Mekalanos 1988)

***Brucella melitensis* 16M biovar1** : Cette souche de *Brucella* a été utilisée tout au long de ce travail. De phénotype lisse et devenu spontanément résistante à l'acide nalidixique (Nal^R), ce mutant a été sélectionné au laboratoire de biologie moléculaire (URBM) aux FUNDP à Namur. Elle a par ailleurs été isolée sur le terrain en 1955 et provient d'A. MacMillan (Central Veterinary Laboratory, UK). Les souches mutantes Δ*fliC* et Δ*flbT* ont été obtenues par remplacement allélique du gène d'intérêt par une cassette *aphA4*, contenant un gène de résistance à la kanamycine (*kan^R*) (J. Ferooz).

2. *Souris*

Les souris BALB/c, âgées de 10 à 14 semaines, utilisées au cours de ce travail proviennent d'un élevage réalisé au sein de l'animalerie des FUNDP (Namur).

3. *Plasmides*

pMR10 : Plasmide réplcatif, à faible nombre de copies chez *Brucella* (2-3 copies par cellules), qui possède une origine de réplcation RK2oriV. Il possède un gène de résistance à la kanamycine (*kan^R*) et permet la réalisation du test blanc/bleu.

pMR10-cat : Ce plasmide est directement dérivé du pMR10 et possède, en plus du gène de résistance à la kanamycine (*kan^R*), un gène de résistance au chloramphénicol (*cat*) (R. Robert, données non publiées).

Composition du milieu minimum de Plommet			
<i>Substrat (g/l)</i>			
Erythritol	2		
<i>Sel et base minérale (g/l)</i>			
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5	NaCl	5
K ₂ HPO ₄	7	MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,01
KH ₂ PO ₄	3	Mn ²⁺ (MnSO ₄)	0,0001
NA ₂ S ₂ O ₃ , 5H ₂ O	0,1	FeSO ₄ , 7H ₂ O	0,0001
<i>Vitamines (mg/l)</i>			
Thiamine	0,2		
Nicotinate	0,2		
Pantothenate	0,04		
Biotine	0,0001		

Composition du MEM-NEAA	
<i>Acides aminés</i>	<i>Concentration (mg/l)</i>
Glycine	750
L-Alanine	890
L-Asparagine	1320
L-Acide aspartique	1330
L-Acide glutamique	1470
L-Proline	1150
L-Serine	1050

pBBRMCS-1 : Plasmide réplcatif à moyen nombre de copies chez *Brucella* (10 à 15 copies par cellules via son origine de replication REP) et doté d'un gène de résistance au chloramphénicol (*cat*). Il permet la réalisation du test blanc/bleu (Kovach, Elzer et al. 1995).

pGEM : Vecteur de clonage possédant le gène *bla* conférant la résistance à l'ampicilline et permettant la réalisation du test blanc/bleu (Promega).

B. Milieux de culture

Tous les milieux destinés à la culture bactérienne sont autoclavés durant 20 minutes, à 121°C et sous une pression de 20 bars (à l'exception du milieu de Plommet). En fonction de leur utilisation, ceux-ci sont refroidis puis supplémentés en antibiotiques, avant d'être coulés dans des boîtes de pétri pour les milieux solides.

1. Milieux de culture riche pour *E. coli* : milieu Luria Bertani (LB)

(pour 1l d'eau désionisée)	forme liquide	forme solide
Hydrolysate de caséine (peptone)	10 g	10 g
Yeast extract	5 g	5 g
NaCl	5 g	5 g
Agar	/	15 g

2. Milieux de culture riche pour *B. melitensis* 16M: milieu 2YT

(pour 1l d'eau désionisée)	forme liquide	forme solide
Mix pour LB liquide	20 g	35 g
Hydrolysate de caséine (peptone)	6 g	6 g
Yeast extract	5 g	5 g
Agar	/	1 g

3. Milieux de culture pour l'étude de la croissance de *B. melitensis* 16M *in vitro*

Afin d'étudier la croissance de *Brucella melitensis* 16M *in vitro*, deux milieux de culture ont été utilisés en plus du milieu 2YT liquide :

1. Milieu RPMI1640 (Invitrogen) additionné d'érythritol (2 g/l).
2. Milieu de Plommet (voir ci-dessous pour sa composition) additionné d'érythritol (2 g/l) ainsi que d'acides aminés non-essentiels (dilution 25X de MEM-NEAA, Gibco-Invitrogen).

4. Milieu de culture pour les cellules HeLa : milieu RPMI

Milieu RPMI1640 (Gibco-Invitrogen) complémenté par:	
FBS décomplémenté (20' à 56°C)	10%
L-glutamine	1%
Pyruvate de sodium	1%

5. Milieu de culture pour les cellules RAW 264.7 : milieu DMEM

Les cellules RAW 264.7 ont été maintenues dans du milieu DMEM (Réf. 52100021 ; Invitrogen) supplémenté avec du bicarbonate (7,5 g/l) (Réf. 25080060 ; Invitrogen) et du FBS décomplémenté (10%) (Réf. 10270-106 ; Invitrogen)

C. Antibiotiques, tampons et solutions

1. Antibiotiques

Nom	Abrév.	Solution de dissolution	Concentration stock (1000X)
Acide nalidixique	Nal	NaOH 0,2N	25 mg/ml
Ampicilline	Amp	H ₂ O	100 mg/ml
Chloramphénicol	Cm	Ethanol 100%	20 mg/ml
Kanamycine	Kan	H ₂ O	50 mg/ml
Gentamycine	Genta	H ₂ O	50 mg/ml
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside	IPTG	Ethanol 70%	100 mM
5-bromo-4-chloro-3-indoyl-βD-galactopyranoside	X-gal	Diméthylformamide	2 mg/ml

Les antibiotiques sont filtrés stérilement à l'aide d'un filtre 0,22 µm avant d'être aliquotés et stockés à -20°C. Ils sont dilués 1000X lors de leur utilisation dans un milieu.

2. Tampons et solutions

2.1. Tampons relatifs à l'extraction d'ADN plasmidique

Tampon S1 (à conserver à 4°C)		Tampon S2		Tampon S3	
Tris-HCl pH 8	50 mM	SDS	1%	Acétate de potassium pH 5,5	3 M
RNAse A	100 µg/ml	NaOH	200 mM		
EDTA	10 mM				

2.2. Tampons relatifs à l'analyse de l'expression d'une protéine par Western Blot

Tampon de dénaturation des protéines		Running Buffer 10X (pour 1l d'eau désionisée)		Towbin Buffer (pour 1l d'eau désionisée)	
SDS 10%	2 g	Tris 0,250 M	30,35 g	Tris 0,250 M	5,8 g
Glycérol 50%	10 ml	SDS	10 g	SDS	0,37 g
β -mercaptoéthanol	5 ml	Glycine	144 g	Glycine	2,9 g
Tris 1,5 M pH 6,8	13 ml			Méthanol	200 ml
Bleu de bromophénol	0,005 g				

Pour un petit gel			
Stacking gel (3 ml)		Running gel (12%) (10 ml)	
Acrylamide mix	1,71 ml	Acrylamide mix	3,2 ml
Eau bidistillée	480 μ l	Eau bidistillée	4 ml
Tris 0,5 M pH 6,8	750 μ l	Tris 1,5 M pH 8,8	2,5 ml
SDS	30 μ l	SDS	100 μ l
APS 10%	30 μ l	APS 10%	100 μ l
TEMED	3 μ l	TEMED	8 μ l

Solution de stripping d'une membrane (pour 1l d'eau désionisée)		Solution de révélation (pour 10 ml)	
Tris 62,3 mM	7,55 g	Acide coumarique	25 μ l
SDS 2%	20 g	Luminol	50 μ l
β -mercaptoéthanol 100 mM	7,813 g	H ₂ O ₂	3 μ l
		ECL Buffer	10 ml

2.3. Tampons divers

Tampon TAE 50X (pour 1l d'eau désionisée)		PBS 20X (pour 1l d'eau désionisée)		PBS Triton-X100 0,1% (pour un volume de 500 ml)	
EDTA	50 mM	Na ₂ HPO ₄ 10 mM	28,2 g	PBS 10X	50 ml
Tris-HCl pH 8	40 mM	K ₂ HPO ₄ 2 mM	4 g	Triton-X100	0,5 g
Acide acétique	57,1 ml	KCl 2,7 mM	4 g	H ₂ O	450 ml
		NaCl 137 mM	160 g		
		(apporter à pH 7,4)			

D. Techniques relatives à l'utilisation d'ADN

1. PCR (Polymerase Chain Reaction)

La technique 'PCR' est utilisée afin d'amplifier rapidement un fragment d'ADN d'intérêt. Pour ce faire, il est nécessaire de connaître les séquences bordant ces fragments afin de concevoir des paires d'amorces oligonucléotidiques (également nommées primers) complémentaires à celles-ci ; un des primer s'hybride au brin « sens », l'autre au brin « antisens ». Au cours du processus, la matrice d'ADN (en présence de dNTPs, de la paire d'amorces d'intérêt ainsi que d'une ADN polymérase thermorésistante) est chauffée à 94°C afin d'être dénaturée. La température est par la suite diminuée pour permettre l'hybridation des deux primers. La séquence nucléotidique comprise entre ces deux derniers est alors amplifiée par une ADN polymérase (*GoTaq* (Promega), utilisée pour les PCRs diagnostiques, ou *Phusion* (Finnzymes), utilisée pour les clonages) à une température optimale à son fonctionnement. La répétition successive de ce processus « dénaturation-hybridation-élongation » (25-30 fois) permet ainsi d'accroître le nombre de copies du fragment d'ADN cible et ce, de manière exponentielle.

Mix PCR

Réactifs	Quantité (Volume finale = 50 µl)
Matrice d'ADN (1-20 ng)	1 µl
Tampon 5X spécifique à l'enzyme utilisée	10 µl
Primer amont (10µM (<i>Phusion</i>) ou 20 µM (<i>GoTaq</i>))	1 µl
Primer aval (10µM (<i>Phusion</i>) ou 20 µM (<i>GoTaq</i>))	1 µl
Mix de dNTP's 5 mM	2 µl
ADN polymérase	0,5 µl
Eau distillée stérile	34,5 µl

Programme (spécifique à la *GoTaq*)

Etape	Durée et température associée
Dénaturation initiale	4 minutes à 94°C
Cycle (répété 25 fois)	
Dénaturation	30 secondes à 94°C
Hybridation	30 secondes à X°C
Elongation	Y minutes à 72°C
Elongation finale	10 minutes à 72°C

Remarques: - Etant donné que la *GoTaq* polymérase introduit des mutations à haut taux (1 mutation tous les 10.000 nucléotides) celle-ci est utilisée dans le cadre de PCR diagnostiques. La *Phusion*, quant à elle, de par sa fonction "proofreading" est utilisée pour les cas de clonage.

- Pour la *GoTaq*, $X = T_m - 10^\circ\text{C}$ où T_m représente la température de melting des amorces ($T_m = 4(G + C) + 2(A + T)$). Il est à noter que ce calcul ne prend en compte que la partie des amorces qui s'hybride lors du premier cycle du processus et ne considère pas les séquences ajoutées en 5'. Pour la *Phusion*, cfr. Finnzymes.

- Y représente la taille du fragment d'ADN à amplifier (en Kb). La *GoTaq* et la *Phusion* allongent respectivement le brin néoformé à raison de 1 et 4 Kb par minute.

PCR sur colonies (lysats clairs)

La technique 'PCR' peut également être appliquée en partant directement de colonies bactériennes ; offrant ainsi l'avantage de ne pas devoir extraire l'ADN génomique ou plasmidique car ces derniers pourront être libérés grâce à la centrifugation à haute vitesse d'une colonie resuspendue dans un petit volume de PBS. Cette méthode, principalement utilisée pour le diagnostique, se réalise comme suit :

- Piquer au cure-dent les colonies d'intérêt et resuspendre dans 50 µl de PBS.
- Chauffer les échantillons pendant 20-30 minutes à 80°C. (s'il s'agit de *B. melitensis*, il conviendra de chauffer les échantillons pendant 1 heure à 80°C afin de les inactiver)
- Centrifuger les échantillons pendant 5' à 14000 rpm afin de culotter les déchets membranaires ; le matériel génétique se retrouve, au moins en partie, dans le surnageant.
- Prélever 1 µl de surnageant et suivre le protocole standard de PCR.

Primers utilisés au cours de ce travail

Nom du primer	Séquence
F1 BamHI pFliC	5'-cgggatccaatgcccgatcatgttgatgc-3'
F2 XbaI tFliC	5'-gctctagatgccagacaggatgtcgggc-3'
F3 XbaI pLac	5'-gctctagatagatagagcgcaacgcaattaatgtgag-3'
F4 FliC pLac rev	5'-gtttgtaagaatgctagccatagctgttctctgtgtgaaattg-3'
F5 FliC fwd	5'-atggctagcattcttacaactcgt-3'
F6 BamHI FliC rev	5'-cgggatccttagccgcggaacagcg-3'
F7 FliC int1F	5'-tccatcgcaacgtcgatgaa-3'
F8 FliC int2R	5'-cattgagatcggtcgtcgg-3'

2. Extraction d'ADN plasmidique (Miniprep)

Cette technique vise à isoler et purifier l'ADN plasmidique de bactéries. La miniprep se réalise en 5 étapes distinctes successives : lyse alcaline des bactéries, élimination des débris cellulaires et des protéines, précipitation de l'ADN, lavage de l'ADN et resuspension de l'ADN.

Au cours de ce travail, l'extraction plasmidique a été réalisée sur base du kit Nucleospin (« Plasmid DNA Purification ») ou selon un protocole classique de miniprep :

- Inoculer 10 ml de LB (supplémenté ou non en antibiotique) avec une colonie isolée et incubé sur la nuit à 37°C sous agitation.
- Prélever 1,5 ml de préculture dans un eppendorf et centrifuger 5' à 13000 rpm. (concentrer les échantillons s'il s'agit de plasmide à faible nombre de copies)
- Éliminer le surnageant à la pompe à vide.
- Ajouter 300 µl de tampon S1 et resuspendre le culot.
- Ajouter 300 µl de tampon S2 ; mélanger par inversions et laisser 5' à RT.
- Ajouter 300 µl de tampon S3 ; mélanger par inversions et incubé 10' sur glace.
- Centrifuger 15' à 13000 rpm et récupérer le surnageant.
- Ajouter 0,7 volume d'isopropanol (~ 630 µl) et mélanger par inversions.
- Centrifuger 15' à 13000 rpm et éliminer le surnageant.

- Ajouter 300 µl d'éthanol 70% (stocké à -20°C).
- Centrifuger 5' à 13000 rpm et éliminer le surnageant.
- Laisser sécher 30' à 37°C ou 10' au SpeedVac.
- Resuspendre dans 20 µl d'eau désionisée.

3. Restriction d'ADN plasmidique et ligation

Les enzymes de restriction sont des endonucléases capables de reconnaître et de cliver spécifiquement de courtes séquences d'ADN double brin de 4 à 10 paires de bases souvent palindromiques. Les extrémités nucléotidiques générées après clivage peuvent être soit « protrudantes » (ou « collantes ») soit « franches » (ou « blunt »). Cette technique vise deux objectifs ; la restriction diagnostique de plasmides (cartographie et quantification de l'ADN) ainsi que la restriction dans le cadre du clonage d'insert dans un plasmide. Pour ce second cas de figure, une réaction de ligation succède à l'étape de restriction et permet de lier de manière covalente deux fragments d'ADN, pour autant que ceux-ci possèdent des extrémités compatibles (deux bouts « francs » ou deux bouts « collants » complémentaires).

Restriction

- Prélever 1 à 5 µl d'ADN plasmidique en suspension dans de l'eau désionisée.
- Ajouter 1 µl de tampon de restriction 10X spécifique à l'enzyme utilisée.
- Ajouter X µl d'enzyme de restriction (celle-ci doit constituer au maximum 1/10 du volume finale, soit entre 2 et 10 unités d'enzyme par µg d'ADN engagé ; 1 unité représente la quantité d'enzyme X nécessaire pour restreindre entièrement 1 µg d'ADN du phage λ en 1 heure, à 37°C et dans un volume de 25 µl)
- Porter le volume à 10 µl avec de l'eau désionisée
- Incuber 1 heure à 37°C (bain-marie)

Ligation (pour un volume finale de 15µl)

- Prélever les quantités requises en insert et vecteur de telle sorte qu'un ratio de 3 pour 1 soit respecté.
- Ajouter 3 µl de tampon T4 DNA ligase 5X.
- Ajouter 1,5 µl de T4 DNA ligase.
- Porter à 15 µl en ajoutant de l'eau désionisée.
- Incuber sur la nuit à 18°C.

4. Purification sur colonne

Cette technique a été utilisée dans cette étude afin de purifier des fragments d'ADN double brin issus de restrictions enzymatiques ainsi que de réactions 'PCR'. Pour ce faire, le protocole du kit 'High Pure Plasmid Isolation' de Roche a été suivi.

5. *Electrophorèse sur gel d'agarose*

Cette technique permet de séparer, par l'intermédiaire d'un champ électrique, des fragments d'ADN directement en fonction de leur taille. La quantité d'agarose utilisée est inversement proportionnelle à la taille des fragments à séparer (ici, 1% d'agarose). Cette dernière peut par ailleurs être estimée en faisant migrer, parallèlement aux échantillons, un marqueur de tailles, constitué de fragments d'ADN de taille connue (GeneRuler™ 1 kb DNA ladder). La révélation des fragments d'ADN est assurée par l'intermédiaire de l'ajout, dans le gel d'agarose avant polymérisation, de bromure d'éthidium ; un agent intercalant fluorescent une fois placé sous UVs. L'intensité du signal fluorescent d'un fragment d'ADN donné est directement proportionnelle à sa taille ainsi qu'à sa quantité. Dès lors, en connaissant au préalable la quantité d'ADN associée aux marqueurs de taille, il est possible d'évaluer la quantité d'ADN du fragment d'intérêt en comparant l'intensité des signaux fluorescents.

La procédure se déroule comme suit (pour un petit gel) :

- Dissoudre par chauffage 0,5 g d'agarose dans 50 ml de tampon TAE 1X
- Ajouter 5 µl de bromure d'éthidium (2 mg/ml d'eau désionisée)
- Après refroidissement, couler le gel dans son support muni de peignes destinés à délimiter les puits.
- Disposer le gel dans une cuve remplie de tampon TAE 1X
- Charger les échantillons (~10 µl/puit) auxquels a été ajouté au préalable de la solution d'alourdisseur 10X, composée d'EDTA 100 mM, de SDS 1%, de glycérol 50% et de méthyl orange.
- En parallèle, charger 5 µl/puit de marqueur moléculaire.
- Appliquer une différence de potentiel d'environ 100 V et laisser migrer.
- Révéler sous UVs.

E. Techniques relatives aux protéines

1. *Analyse de l'abondance d'une protéine par Western Blot*

Cette technique permet de détecter de manière spécifique l'abondance d'une protéine d'intérêt au sein d'un mélange protéique. Cette méthode comporte 3 étapes principales : séparation d'un mélange de protéines par une électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE), transfert des protéines sur une membrane et détection immunologique de la protéine d'intérêt grâce à des anticorps spécifiques.

Préparation d'extraits protéiques totaux

- Inoculer une culture de 50 ml de 2YT (avec ou sans antibiotiques) à une DO_{600nm} de 0,05 avec la souche d'intérêt. (le Western Blot peut également se réaliser à partir de préculture)
- Incuber à 37°C sous agitation pendant la durée souhaitée.
- Après incubation, prendre la DO_{600nm} et déterminer le volume de culture à prélever afin d'obtenir une DO_{600nm} de 10 après resuspension du culot bactérien dans 50 µl de PBS. (de cette manière, on s'assure qu'en chargeant le même volume d'échantillons protéiques préparés pour chaque souche, on charge des quantités équivalentes de protéines totales)

- Centrifuger l'échantillon 10 minutes à 5000 rpm, éliminer le surnageant et resuspendre dans 500 µl de PBS.
- Recentrifuger 10 minutes à 5000 rpm, éliminer le surnageant et resuspendre dans 50 µl de PBS.
- Inactiver les échantillons en les mettant 1 heure dans un bain-marie à 80°C et stocker si nécessaire à -20°C.
- (Avant de charger le gel, ajouter 50 µl de tampon de dénaturation aux échantillons, les chauffer 10 minutes à 95°C et les placer directement sur glace)

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS) (détergent anionique destiné à conférer aux protéines déployées une charge négative globale par unité de masse) permet, de part son caractère dénaturant, de séparer des protéines uniquement sur base de leur poids moléculaire. Pour ce faire, la migration des protéines se déroule successivement dans un gel d'empilement (« stacking gel »), dont la fonction est de concentrer les échantillons protéiques, puis dans un gel de séparation (« running gel »). La concentration de ces deux gels en agents réticulants (acrylamide et bisacrylamide) est inversement proportionnelle à la taille des protéines à séparer. Dans cette étude, seul des gels à 12% d'acrylamide ont été utilisés.

Une fois que les protéines ont été dénaturées (cfr. préparation d'extraits protéiques totaux), un volume égal de chaque échantillon (20 µl pour un petit gel) est chargé dans les pistes du gel. Un puit sera réservé au marqueur de poids moléculaire tandis que les puits n'accueillant aucun échantillon seront remplis de tampon de dénaturation, dans le but d'assurer le suivi d'un front de migration homogène. Pour la migration, appliquer une différence de potentielle de 300 V (40 mA et 100 W). Le temps de migration est fonction du poids moléculaire de la protéine d'intérêt et du pourcentage du gel.

Transfert sur membrane de nitrocellulose

Après l'électrophorèse, les protéines présentes au sein du gel de polyacrylamide sont transférées dans du tampon *Towbin*, grâce à un appareil de transfert (« semi dry ») sur une membrane de nitrocellulose. Pour ce faire, une différence de potentiel de 10-14 V est appliquée entre le gel de polyacrylamide et la membrane de nitrocellulose, afin de permettre le transfert des protéines, chargées négativement, vers celle-ci. L'ampérage doit être compris entre 0,8-3 mA par cm² de membrane de nitrocellulose afin que le transfert soit optimal.

Immunodétection

Cette technique, basée sur la reconnaissance d'épitopes protéiques par des anticorps, permet de détecter de manière spécifique une protéine d'intérêt après les étapes de migration et de transfert citées ci-dessus. Elle comporte plusieurs étapes :

- Avant de mettre la membrane de nitrocellulose en présence des anticorps, il est nécessaire de saturer les sites protéiques susceptibles de lier ceux-ci de manière non-spécifique, afin d'éviter un bruit de fond important au moment de la révélation. Il est ainsi nécessaire

d'incuber la membrane à 4°C sur la nuit avec une solution de saturation (PBS 1X – Tween 0,05 à 0,1% - Lait 1 à 5%).

- Mettre la membrane en présence de l'anticorps primaire dilué dans du PBS 1X – Tween 0,05 à 0,1% - Lait 1 à 5% et incuber environ 1 heure sous agitation à température ambiante.
- Laver la membrane 5 fois 3 minutes sous agitation avec du PBS 1X – Tween 0,05 à 0,1%.
- Mettre la membrane en présence de l'anticorps secondaire reconnaissant spécifiquement le fragment constant (Fc) de l'anticorps primaire utilisé, dilué dans PBS 1X – Tween 0,05 à 0,1% - Lait 1 à 5%. Grâce à la peroxydase (Horse Raddish Peroxidase) qui lui est conjuguée (enzyme capable de catalyser l'oxydation du luminol et associée à la production de lumière), l'anticorps secondaire permet de révéler de manière indirecte l'abondance de la protéine d'intérêt.
- Laver une nouvelle fois la membrane 5 fois 3 minutes sous agitation avec du PBS 1X – Tween 0,05-0,1%.

Révélation

La technique de révélation utilise une solution de révélation maison et se déroule en chambre noire. Le coté de la membrane de nitrocellulose ayant fixé les protéines est recouverte par la solution de révélation. Par la suite, la membrane est recouverte d'un film autoradiographique et le temps d'exposition dépend de l'abondance de la protéine et donc de l'intensité du signal obtenu. Le film est alors placé dans un appareil de révélation (Kodak) dans lequel celui-ci passe successivement dans un bain de révélateur, dans une solution de fixation et dans une solution de rinçage.

Anticorps primaires utilisés	Source et dilution	Solution de dilution
Anti-FliC	Sérum de lapin (1:3000)	PBS 1X - Tween 0,1% - Lait 1%
Anti-Omp19	Surnageant d'hybridome (1:10)	PBS 1X - Tween 0,05% - Lait 5%
Anti-Omp25	Surnageant d'hybridome (1:100)	PBS 1X - Tween 0,05% - Lait 5%
Anti-Omp31	Surnageant d'hybridome (1:100)	PBS 1X - Tween 0,05% - Lait 5%
Anti-Omp89	Surnageant d'hybridome (1:50)	PBS 1X - Tween 0,05% - Lait 5%
Anti-PrlR	Sérum de lapin (1:1000)	PBS 1X - Tween 0,05% - Lait 1%
Anticorps secondaires utilisés		
Goat anti-mouse HRP	(GE Healthcare) (1:10000)	PBS 1X - Tween 0,1% - Lait 1%
Gpat anti-rabbit HRP	(GE Healthcare) (1:10000)	PBS 1X - Tween 0,1% - Lait 1%

Stripping de la membrane

Il est possible de réutiliser les membranes de nitrocellulose pour réaliser un nouveau Western Blot, et donc mettre en évidence l'abondance d'une autre protéine via l'usage d'un anticorps primaire différent :

- Mettre la membrane de nitrocellulose en présence de la solution de *stripping* pendant 15-20 minutes afin de décrocher les anticorps primaires.
- Laver 3 X 10 minutes la membrane avec du PBS 1X – Tween 0,05-0,1%.
- Saturer une nouvelle fois, comme décrit ci-dessus, les sites susceptibles de lier de manière non-spécifique les nouveaux anticorps primaires.

2. Analyse de l'abondance d'une protéine dans le surnageant d'une culture bactérienne

L'analyse de l'abondance d'une protéine par Western Blot peut également être appliquée aux protéines du surnageant d'une culture bactérienne. Pour ce faire, il est nécessaire de recourir à une étape de précipitation des protéines. Ainsi :

- Centrifuger la culture 10 minutes à 3500 rpm et récupérer le surnageant à l'aide d'une seringue munie d'un filtre de 0,22 µm de porosité (ceci permet d'éliminer les *Brucella* éventuellement présentent dans le surnageant).
- Mettre 1 volume de surnageant en présence d'1 volume de PRMM dans un tube COREX.
- Homogénéiser et laisser sur la nuit à 4°C.
- Centrifuger l'échantillon 1 heure à 10000 rpm et à 4°C.
- Enlever le surnageant et ajouter 2 ml d'acétone 100%.
- Centrifuger l'échantillon 8 minutes à 8000 rpm et à 4°C.
- Enlever l'acétone, laisser sécher le culot à l'air libre et le resuspendre dans 20 µl de tampon de dénaturation ; l'échantillon est prêt à être chargé sur gel après l'avoir chauffé 10 minutes à 95°C.

Tampon de précipitation des protéines; PRMM (pour 500ml de solution)	
Pyrogallol red 0,05mM	0,1 g
Molybdate de sodium 0,16mM	0,02 g
Oxalate de sodium 1mM	0,067 g
Acide succinique 50mM	6,75 g
Méthanol 20%	100 ml
Eau désionisée	~400 ml
(Mise à pH2 avec de l'HCl)	

F. Techniques relatives à l'utilisation de bactéries

1. Transformation par choc thermique

La transformation bactérienne est un processus biologique au cours duquel de l'ADN exogène (par exemple, un plasmide) est internalisé dans une bactérie. Dans cette étude, la transformation chimique a été utilisée afin de transformer les souches DH10B et S17-1λpir d'*Escherichia coli*. Pour ce faire, ces dernières ont été préalablement traitées par passage dans une solution hypotonique de chlorure de calcium (CaCl₂) afin de rendre leur paroi perméable à l'ADN ; les bactéries sont alors dites « compétentes ».

La technique se réalise comme suit :

- Ajouter 5-10 µl du plasmide d'intérêt à 100 µl de bactéries CaCl₂ compétentes et laisser 30 minutes sur glace. (pendant ce laps de temps, l'ADN s'associe au calcium en formant un complexe résistant aux désoxyribonucléases qui adhère à la bactérie)
- Réaliser un choc thermique (1 minute à 37°C) afin de permettre l'entrée du complexe dans la bactérie.

- Ajouter 900 µl de LB liquide et incubé 45 minutes à 37°C sous agitation afin de permettre à la bactérie de reconstituer sa paroi et d'exprimer le ou les gène(s) de résistance introduits.
- Étaler 100 µl sur milieu sélectif approprié.
- Culotter par centrifugation les bactéries restantes (5 minutes à 5000 rpm), resuspendre et étaler 100 µl.
- Incuber une nuit à 37°C.

2. L' α -complémentation

En plus de sélectionner les bactéries selon l'acquisition de gènes de résistance à des antibiotiques, un test permet de repérer visuellement les *E. coli* DH10B transformées par un plasmide recombinant portant un insert disruptant le gène *lacZ'*. En effet, cette souche possède dans son génome le gène *lacZ Δ M15*, codant uniquement pour la partie C-terminal de la β -galactosidase qui est donc inactive. Cependant, il est possible de rendre cette protéine fonctionnelle suite à l'apport en *trans* d'un plasmide portant le gène *lacZ'* qui code pour la partie N-terminale de l'enzyme ; ce processus est nommé « α -complémentation ». La protéine reconstituée est capable de cliver un substrat chromogène, le X-gal, qui, en s'accumulant dans la bactérie, donne une teinte bleutée à la colonie résultante. Dès lors, si des colonies blanches sont obtenues à la suite du test, cela signifie que les bactéries ont acquis un plasmide portant un insert disruptant le gène *lacZ'*, incapable de fournir la portion N-terminale de l'enzyme. Il est à noter qu'il est nécessaire d'ajouter de l'IPTG au milieu de culture afin d'inhiber LacI, une protéine réprimant l'expression de *lacZ'* en se fixant sur son promoteur.

3. Conjugaison

La conjugaison entre bactéries Gram-négatives est un transfert horizontal de matériel génétique. Au cours de celui-ci la bactérie donneuse délivre, par l'intermédiaire d'un pilus sexuel, un plasmide conjugalif (possédant une origine de transfert) vers une bactérie receveuse. La souche donneuse (pour cette étude *E. coli* S17-1 λ pir) possède le plasmide RP4, intégré dans son chromosome et non-mobilisable, codant pour l'ensemble des protéines requises pour effectuer ce transfert.

Après avoir lancé en préculture les souches d'intérêt :

- Mettre 50 µl d'*E. coli* S17-1 λ pir donneuse, transformée avec le plasmide d'intérêt, en présence d'1 ml de *Brucella melitensis* receveuse en phase stationnaire de croissance.
- Centrifuger 1 minute à 7000 rpm ; enlever le surnageant et resuspendre le culot dans 1 ml de 2YT liquide.
- Centrifuger 1 minute à 7000 rpm et enlever le surnageant en laissant environ 50 µl.
- Resuspendre le culot avec le milieu restant ; déposer une goutte sur 2YT solide et incubé sur la nuit à température ambiante.
- Après incubation, strier la goutte sur 2YT solide sélectif supplémenté en acide nalidixique ainsi qu'en antibiotique(s) approprié(s) et incubé 3-4 jours à 37°C.

4. Analyse de la croissance bactérienne *in vitro* – BioScreen

Cette technique automatisée permet d'analyser la croissance de bactéries *in vitro* (dans notre cas *Brucella melitensis* 16M) de manière précise et ce, sur plusieurs jours, en mesurant, à intervalle de temps régulier, la densité de cultures bactériennes à une DO de 600 nm :

- Le premier jour, inoculer 10 ml de 2YT liquide, supplémenté ou non en antibiotique, avec la souche bactérienne d'intérêt et incuber sur la nuit à 37°C sous agitation.
- Le jour suivant, diluer la préculture de telle manière à obtenir une DO_{600nm} de 0,1 dans un volume de 2YT, de RPMI160 additionné d'érythritol (2 g/l) ou de milieu minimum de Plommet supplémenté en acides aminés non-essentiels (1:25) et en érythritol (2 g/l).
- Le troisième jour, diluer une nouvelle fois les précultures, afin de les lancer en culture de 200 µl à DO_{600nm} de 0,05.

G. Techniques relatives à l'utilisation de *Brucella* en infection

1. Infection de cellules par *Brucella melitensis* 16M

Cette technique permet d'évaluer la virulence d'une souche de *Brucella ex vivo*, en infectant une monocouche de cellules hôtes. Au cours de cette étude, des cellules HeLa ainsi que des macrophages murins RAW 264.7 ont été utilisés.

Préparation des cellules mammaliennes pour l'infection

Celle-ci se déroule la veille de l'infection, à partir de flasques de cellules mammaliennes à sous-confluence :

- Retirer le milieu de culture et décrocher les cellules ; ajouter 5 ml de milieu et gratter avec un râtelier pour les RAWs, utiliser du PBS supplémenté en trypsine pour les cellules HeLa.
- Récupérer les cellules dans 5 ml de milieu spécifique et centrifuger 10 minutes à 1200 rpm.
- Retirer le surnageant et resuspendre le culot dans 1 ml de milieu spécifique.
- Evaluer la densité cellulaire à l'aide d'une chambre de comptage (cellule de Neubauer).
- Calculer le volume à prélever pour obtenir une densité de $2 \cdot 10^5$ cellules/ml de milieu spécifique pour les infections en plaques 24 puits ($1 \cdot 10^5$ cellules/ml pour des plaques 96 puits).
- Si l'infection se déroule en plaque 24 puits, dispenser 500 µl de la dilution de cellules par puit (il y a donc $1 \cdot 10^5$ cellules par puit) et incuber sur la nuit à 37°C (5% CO₂). Pour les infections en plaques 96 puits, dispenser 100 µl de dilution de cellules par puit ($1 \cdot 10^4$ cellules/puit).

Infection des cellules hôtes (pour des plaques 24 puits)

(La veille, inoculer 10 ml de 2YT, avec antibiotiques si nécessaire, avec la souche infectante)

- Laver la culture bactérienne (centrifuger 10 minutes à 3500 rpm et resuspendre le culot dans 10 ml de PBS 1X).
- Prendre la DO_{600nm} et diluer les bactéries de telle sorte à obtenir une dose infectante de 300 bactéries/cellule, c'est-à-dire une suspension bactérienne à $6 \cdot 10^7$ bactéries/ml (cfr. $1 \cdot 10^5$ cellules par puit).

Gene	Official gene symbol	Full name(s)	Sense and antisense primer sequences
House keeping gene			
S12	Rps12	Ribosomal protein S12	5'-GGAAGGCATAGCTGCTGGAGGTGT-3' 5'-CCTCGATGACATCCTTGGCCTGAG-3'
M2-associated genes			
ARG1	Arg1	Arginase 1, liver	5'-ATGGAAGAGACCTTCAGCTAC-3' 5'-GCTGTCTTCCCAAGAGTTGGG-3'
FIZZ1	Rtnla	Resistin like alpha	5'-CCCAGGATGCCAACTTTGAA-3' 5'-GGCCCATCTGTTCATAGTCT-3'
MGL1	Mgl1	Macrophage galactose N-acetyl-galactosamine specific lectin 1	5'-ATGATGTCTGCCAGAGAACC-3' 5'-ATCACAGATTTCAGCAACCTTA-3'
MGL2	Mgl2	Macrophage galactose N-acetyl-galactosamine specific lectin 2	5'-GATAACTGGCATGGACATATG-3' 5'-TTTCTAATCACCATAACACATTC-3'
MMR	Mrc1	Mannose receptor, C type 1 or macrophage mannose receptor	5'-GCAAATGGAGCCGTCTGTGC-3' 5'-CTCGTGGATCTCCGTGACAC-3'
Ym1 (and Ym2)	Chi3l3	Chitinase 3-like 3 or eosinophil chemotactic factor-L	5'-GGGCATACCTTTATCCTGAG-3' 5'-CCACTGAAGTCATCCATGTC-3'
M1-associated genes			
iNOS	Nos2	Nitric oxide synthase 2, inducible, macrophage	5'-TCCACCAGGAGATGTTGAAC-3' 5'-TGGAGCCAAGGCCAAACACAG-3'
IL-12 p35	Il12a	Interleukin 12A or IL-12, subunit p35	5'-GATGACATGGTGAAGACGGCC-3' 5'-GGAGGTTTCTGGCGCAGAGT-3'
IL-12 p40	Il12b	Interleukin 12B or IL-12, subunit p40	5'-GAAAGACCCTGACCATCACT-3' 5'-CCTTCTCTGCAGACAGAGAC-3'
IL-18	Il18	Interleukin-18 or interferon-gamma-inducing factor	5'-ACAACCTTTGGCCGACTTCAC-3' 5'-GGGTTCACTGGCACTTTGAT-3'
Ryr2	Ryr2	Ryanodine receptor 2, cardiac	5'-AGATCTACCGCATCATCTTTG-3' 5'-GATTCCTGTCCTGTGTGTTTC-3'
STAT1	Stat1	Signal transducer and activator of transcription 1	5'-CGAAGAGCGACCAAAAACAG-3' 5'-TGCTGGAAGAGGAGGAAGGT-3'
STAT4	Stat4	Signal transducer and activator of transcription 4	5'-CATCCCTGAAAACCCTCTGA-3' 5'-GACATGGGGAGAAGGTCTGA-3'
TNF- α	Tnf	Tumor necrosis factor alpha	5'-GTCTACTCCCAGGTTCTCTTC-3' 5'-CCTTCACAGAGCAATGACTC-3'
IL-10 inducible genes			
F XIIIa	F13a	Coagulation factor XIII, alpha subunit	5'-CCAGGAATTAAGCAAGACATC-3' 5'-TGCCCTTACTTTCTAGTTCTC-3'
Selp	Sepp1	Selenoprotein P, plasma 1	5'-TTCTGCAGGCATCCAGATTG-3' 5'-CACAAGACGGCCACATCTGT-3'

➔ Liste des principaux gènes permettant d'étudier l'activation des macrophages par qRT-PCR

- Pour chaque puits, remplacer le milieu par 500 µl de milieu ensemencé.
- Centrifuger les plaques 10 minutes à 1200 rpm afin d'assurer le contact des bactéries aux cellules et incuber 1 heure à 37°C - 5% CO₂.
- (Pendant ce temps d'attente, réaliser des dilutions de la suspension bactérienne (de 10x à 10⁷x dans du PBS 1X), étaler sur 2YT solide et incuber 3-4 jours à 37°C avant que les CFUs ne soient dénombrées afin de contrôler la dose infectante)
- Laver 2 fois chacun des puits avec 500 µl de PBS et ajouter 500 µl de milieu supplémenté en gentamycine dans le but d'éliminer les bactéries extracellulaires.
- Placer les plaques à 37°C (5% CO₂) et incuber le temps souhaité (pour cette étude, 1, 5, 10, 24 ou 48 heures) dans un milieu supplémenté en gentamycine.
- Une fois le temps écoulé traiter les cellules avec du PBS 1X Triton X-100 0,1%, pendant 10 minutes à température ambiante. Récupérer le lysat et réaliser des dilutions sériées (de 10 en 10) avant d'étaler sur 2YT solide (en général, les dilutions 10³X à 10⁵X). Incuber 3-4 jours à 37°C avant que les CFUs ne soient comptabilisées.

Test de cytotoxicité

La cytotoxicité, induite aussi bien par des facteurs chimiques que biologiques, peut être évaluée en quantifiant directement les dégâts provoqués au niveau de la membrane plasmique. Suite à la perte d'intégrité de la membrane plasmique, la lactate déshydrogénase (LDH), une enzyme cytosolique stable retrouvée dans tout type cellulaire est libérée dans le milieu. Elle a été utilisée au cours de ce travail comme marqueur de cytotoxicité. Pour déterminer si certaines souches de *Brucella* avaient un pouvoir cytotoxique plus ou moins important, des macrophages de souris RAW264.7 ont été infectés par celles-ci, à différentes doses infectantes. Par la suite, le milieu de culture a été collecté 24 post-infection pour y doser le LDH en suivant le protocole du kit 'CytoTox 96™ Assay' (Promega).

Analyse du profil d'activation des macrophages

- (La veille, inoculer 10 ml de 2YT, avec antibiotiques si nécessaire, avec la souche infectante)
- Laver la culture bactérienne (centrifuger 10 minutes à 3500 rpm et resuspendre le culot dans 10 ml de PBS 1X).
 - Prendre la DO_{600nm} et diluer les bactéries de telle sorte à obtenir une dose infectante de 300 bactéries/cellule, c'est-à-dire une suspension bactérienne à 6.10⁷ bactéries/ml (cfr. 1.10⁵ cellules par puit).
 - Pour chaque puits, remplacer le milieu par 500 µl de milieu ensemencé.
 - Centrifuger les plaques 10 minutes à 1200 rpm afin d'assurer le contact des bactéries aux cellules et incuber 1 heure à 37°C - 5% CO₂.
 - (Pendant ce temps d'attente, réaliser des dilutions de la suspension bactérienne (de 10x à 10⁷x dans du PBS 1X), étaler sur 2YT solide et incuber 3-4 jours à 37°C avant que les CFUs ne soient dénombrées afin de contrôler la dose infectante)
 - Laver 2 fois chacun des puits avec 500 µl de PBS et ajouter 500 µl de milieu supplémenté en gentamycine dans le but d'éliminer les bactéries extracellulaires.
 - Placer les plaques à 37°C (5% CO₂) et incuber le temps souhaité (24 heures pour cette étude)
 - Une fois le temps écoulé, lyser les macrophages au TriPure™ (Roche Applied Science) et récupérer leur ARN par extraction au chloroforme et précipitation à l'isopropanol.

- Vérifier la pureté (Nanodrop) et la qualité (migration sur gel d'agarose) des ARNs.
- Réaliser la rétrotranscription des ARNs à l'aide du kit 'Transcriptor First Strand cDNA Synthesis' (Roche).
- Réaliser une PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR) (StepOnePlus™ & SyBRGreen – Applied Biosystems) ciblant des gènes spécifiques de la réponse M1 ou M2 du macrophage.
- Estimer l'abondance de l'ARN messager des gènes cibles par la méthode des delta-delta-Ct.

2. Infection de souris par *Brucella melitensis* 16M

Cette technique permet d'évaluer la virulence d'une souche de *Brucella in vivo*. La dose infectante est de 4.10^4 bactéries/souris et la virulence est estimée en dénombrant les CFUs à différents temps post-infection dans la rate et le foie. La procédure est la suivante :

- (La veille de l'infection, inoculer 10 ml de 2YT, avec antibiotiques si nécessaire, avec la souche infectante)
- Laver la culture bactérienne (centrifuger 10 minutes à 3500 rpm et resuspendre le culot dans 10 ml de PBS 1X).
- Prendre la DO_{600nm} (une DO de 1 équivaut à une densité bactérienne de 3.10^9 bactéries/ml) et diluer la suspension bactérienne afin d'obtenir une concentration de 8.10^4 bactéries/ml.
- Infecter les souris par injection intrapéritonéale de 500 μ l de solution bactérienne (soit 4.10^4 bactéries/souris).
- (Contrôler la dose infectante comme décrit dans le point « 1. Infection de cellules mammaliennes par *Brucella melitensis* »)
- A différents temps post-infection (dans cette étude : 5, 12, 21 ou 28 jours), sacrifier les souris par dislocation cervicale, extraire la rate et le foie et les écraser dans un sachet stérile.
- Resuspendre le broyat dans 1 ml de PBS 1X Triton X-100 0,1% afin de lyser les cellules pour récupérer les *Brucella*.
- Réaliser plusieurs dilutions de 10 en 10 dans du PBS 1X, étaler sur 2YT solide et incubé 3-4 jours à 37°C avant de comptabiliser les CFUs.

Remarque

Si l'on souhaite faire des coupes spléniques (coloration Hématoxiline-Eosine-Safran), afin d'en réaliser l'examen cytologique, les rates sont divisées en deux. Cette scission doit alors être prise en compte lors du dénombrement des CFUs.

Bibliographie

Bibliographie

- Ackermann, M. R., Cheville, N. F. & Deyoe, B. L. (1988). "Bovine ileal dome lymphoepithelial cells: endocytosis and transport of Brucella abortus strain 19." Vet Pathol **25**(1): 28-35.
- Akira, S. (2009). "Pathogen recognition by innate immunity and its signaling." Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci **85**(4): 143-56.
- Amer, A. O. (2010). "Modulation of caspases and their non-apoptotic functions by Legionella pneumophila." Cell Microbiol **12**(2): 140-7.
- Andersen-Nissen, E., Hawn, T. R., Smith, K.D., Nachman, A., Lampano, A.E., Uematsu, S., Akira, S. & Aderem, A. (2007). "Cutting edge: Tlr5-/- mice are more susceptible to Escherichia coli urinary tract infection." J Immunol **178**(8): 4717-20.
- Andersen-Nissen, E., Smith, K. D. , Strobe, K. L., Barrett, S. L., Cookson, B. T., Logan, S. M. & Aderem, A. (2005). "Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(26): 9247-52.
- Anderson, P. E. & Gober, J. W. (2000). "FlbT, the post-transcriptional regulator of flagellin synthesis in Caulobacter crescentus, interacts with the 5' untranslated region of flagellin mRNA." Mol Microbiol **38**(1): 41-52.
- Anderson, T. D., Cheville, N. F. & Meador, V. P. (1986). "Pathogenesis of placentitis in the goat inoculated with Brucella abortus. II. Ultrastructural studies." Vet Pathol **23**(3): 227-39.
- Arellano-Reynoso, B., Lapaque, N., Salcedo, S., Briones, G., Ciocchini, A. E., Ugalde, R., Moreno, E., Moriyon, I. & Gorvel, J. P. (2005). "Cyclic beta-1,2-glucan is a Brucella virulence factor required for intracellular survival." Nat Immunol **6**(6): 618-25.
- Barquero-Calvo, E., Chaves-Olarte, E., Weiss, D. S., Guzman-Verri, C., Chacon-Diaz, C., Rucavado, A., Moriyon, I. & Moreno, E. (2007). "Brucella abortus uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection." PLoS ONE **2**(7): e631.

- Batut, J., Andersson, S. G. & O'Callaghan, D. (2004). "The evolution of chronic infection strategies in the alpha-proteobacteria." Nat Rev Microbiol **2**(12): 933-45.
- Beatson, S. A., Minamino, T. & Pallen, M. J. (2006). "Variation in bacterial flagellins: from sequence to structure." Trends Microbiol **14**(4): 151-5.
- Benko, S., Philpott, D. J. & Girardin, S. E. (2008). "The microbial and danger signals that activate Nod-like receptors." Cytokine **43**(3): 368-73.
- Benoit, M., Desnues, B. & Mege, J. L. (2008). "Macrophage polarization in bacterial infections." J Immunol **181**(6): 3733-9.
- Bergsbaken, T., Fink, S. L. & Cookson, B. T. (2009). "Pyroptosis: host cell death and inflammation." Nat Rev Microbiol **7**(2): 99-109.
- Boschiroli, M. L., Foulongne, V. & O'Callaghan, D. (2001). "Brucellosis: a worldwide zoonosis." Curr Opin Microbiol **4**(1): 58-64.
- Briones, G., Inon de Iannino, N., Roset, M., Vigliocco, A., Paulo, P. S. & Ugalde, R. A. (2001). "Brucella abortus cyclic beta-1,2-glucan mutants have reduced virulence in mice and are defective in intracellular replication in HeLa cells." Infect Immun **69**(7): 4528-35.
- Brown, G. D. (2006). "Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor." Nat Rev Immunol **6**(1): 33-43.
- Cario, E. & Podolsky, D. K. (2000). "Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease." Infect Immun **68**(12): 7010-7.
- Cascales, E. & Christie, P. J. (2003). "The versatile bacterial type IV secretion systems." Nat Rev Microbiol **1**(2): 137-49.
- Celli, J. (2006). "Surviving inside a macrophage: the many ways of Brucella." Res Microbiol **157**(2): 93-8.

- Celli, J., de Chastellier, C., Franchini, D. M., Pizarro-Cerda, J., Moreno, E. & Gorvel, J. P. (2003). "Brucella evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum." J Exp Med **198**(4): 545-56.
- Cheers, C. & Pagram, F. (1979). "Macrophage activation during experimental murine brucellosis: a basis for chronic infection." Infect Immun **23**(2): 197-205.
- Chevance, F. F. & Hughes, K. T. (2008). "Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine." Nat Rev Microbiol **6**(6): 455-65.
- Commander, N. J., Spencer, S. A., Wren, B. W. & MacMillan, A. P. (2007). "The identification of two protective DNA vaccines from a panel of five plasmid constructs encoding Brucella melitensis 16M genes." Vaccine **25**(1): 43-54.
- Copin, R., De Baetselier, P., Carlier, Y., Letesson, J. J. & Muraille, E. (2007). "MyD88-dependent activation of B220-CD11b+LY-6C+ dendritic cells during Brucella melitensis infection." J Immunol **178**(8): 5182-91.
- de Jong, M. F., Sun, Y. H., den Hartigh, A. B., van Dijk, J. M. & Tsolis, R. M. (2008). "Identification of VceA and VceC, two members of the VjbR regulon that are translocated into macrophages by the Brucella type IV secretion system." Mol Microbiol **70**(6): 1378-96.
- Delbridge, L. M. & O'Riordan, M. X. (2007). "Innate recognition of intracellular bacteria." Curr Opin Immunol **19**(1): 10-6.
- Delrue, R. M., Deschamps, C., Leonard, S., Nijskens, C., Danese, I., Schaus, J. M., Bonnot, S., Ferrooz, J., Tibor, A., De Bolle, X. & Letesson, J. J. (2005). "A quorum-sensing regulator controls expression of both the type IV secretion system and the flagellar apparatus of Brucella melitensis." Cell Microbiol **7**(8): 1151-61.
- Delrue, R. M., Martinez-Lorenzo, M., Lestrade, P., Danese, I., Bielarz, V., Mertens, P., De Bolle, X., Tibor, A., Gorvel, J. P. & Letesson, J. J. (2001). "Identification of Brucella spp. genes involved in intracellular trafficking." Cell Microbiol **3**(7): 487-97.

- DelVecchio, V. G., Kapatral, V., Redkar, R. J., Patra, G., Mujer, C., Los, T., Ivanova, N., Anderson, I., Bhattacharyya, A., Lykidis, A., Reznik, G., Jablonski, L., Larsen, N., D'Souza, M., Bernal, A., Mazur, M., Goltsman, E., Selkov, E., Elzer, P. H., Hagius, S., O'Callaghan, D., Letesson, J. J., Haselkorn, R., Kyrpides, N. & Overbeek, R. (2002). "The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(1): 443-8.
- Dermine, J. F., Duclos, S., Garin, J., St-Louis, F., Rea, S., Parton, R. G. & Desjardins, M. (2001). "Flotillin-1-enriched lipid raft domains accumulate on maturing phagosomes." J Biol Chem **276**(21): 18507-12.
- Diez, E., Yaraghi, Z., MacKenzie, A. & Gros, P. (2000). "The neuronal apoptosis inhibitory protein (Naip) is expressed in macrophages and is modulated after phagocytosis and during intracellular infection with *Legionella pneumophila*." J Immunol **164**(3): 1470-7.
- Ferguson, G. P., Datta, A., Baumgartner, J., Roop, R. M., 2nd, Carlson, R. W. & Walker, G. C. (2004). "Similarity to peroxisomal-membrane protein family reveals that *Sinorhizobium* and *Brucella* *BacA* affect lipid-A fatty acids." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(14): 5012-7.
- Fernandez-Prada, C. M., Nikolich, M., Vemulapalli, R., Sriranganathan, N., Boyle, S. M., Schurig, G. G., Hadfield, T. L. & Hoover, D. L. (2001). "Deletion of *wboA* enhances activation of the lectin pathway of complement in *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*." Infect Immun **69**(7): 4407-16.
- Feuillet, V., Medjane, S., Mondor, I., Demaria, O., Pagni, P.P., Galàn, J.E., Flavell, R.A. & Alexopoulou, L. (2006). "Involvement of Toll-like receptor 5 in the recognition of flagellated bacteria." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(33): 12487-92.
- Fontes, P., Alvarez-Martinez, M. T., Gross, A., Carnaud, C., Kohler, S. & Liautard, J. P. (2005). "Absence of evidence for the participation of the macrophage cellular prion protein in infection with *Brucella suis*." Infect Immun **73**(10): 6229-36.
- Forestier, C., Deleuil, F., Lapaque, N., Moreno, E. & Gorvel, J. P. (2000). "*Brucella abortus* lipopolysaccharide in murine peritoneal macrophages acts as a down-regulator of T cell activation." J Immunol **165**(9): 5202-10.

- Franchi, L., Amer, A., Body-Malapel, M., Kanneganti, T. D., Ozoren, N., Jagirdar, R., Inohara, N., Vandenabeele, P., Bertin, J., Coyle, A., Grant, E. P. & Nunez, G. (2006). "Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages." Nat Immunol **7**(6): 576-82.
- Fretin, D., Fauconnier, A., Kohler, S., Halling, S., Leonard, S., Nijskens, C., Ferooz, J., Lestrade, P., Delrue, R. M., Danese, I., Vandenhoute, J., Tibor, A., DeBolle, X. & Letesson, J. J. (2005). "The sheathed flagellum of *Brucella melitensis* is involved in persistence in a murine model of infection." Cell Microbiol **7**(5): 687-98.
- Gamazo, C. M., Lecaroz, M. C., Prior, S., Vitas, A., Campanero, M. A., Irache, J. M. & Blanco-Prieto, J. M. (2006). "Chemical and biological factors in the control of *Brucella* and brucellosis." Curr Drug Deliv **3**(4): 359-65.
- Gamazo, C. M., Lecaroz, M. C., Prior, S., Vitas, A., Campanero, M. A., Irache, J. M. & Blanco-Prieto, J. M. (2006). "Chemical and biological factors in the control of *Brucella* and brucellosis." Curr Drug Deliv **3**(4): 359-65.
- Godfroid, F., Taminiau, B., Danese, I., Denoel, P., Tibor, A., Cloeckert, A., Godfroid, J. & Letesson, J. J. (1998). "Identification of the perosamine synthetase gene of *Brucella melitensis* 16M and involvement of lipopolysaccharide O side chain in *Brucella* survival in mice and in macrophages." Infect Immun **66**(11): 5485-93.
- Gorvel, J. P. (2008). "Brucella: a Mr "Hide" converted into Dr Jekyll." Microbes Infect **10**(9): 1010-3.
- Gross, A., Terraza, A., Ouahrani-Bettache, S., Liautard, J. P. & Dornand, J. (2000). "In vitro *Brucella* suis infection prevents the programmed cell death of human monocytic cells." Infect Immun **68**(1): 342-51.
- Guerra, H. (2007). "The brucellae and their success as pathogens." Crit Rev Microbiol **33**(4): 325-31.

- Guzman-Verri, C., Manterola, L., Sola-Landa, A., Parra, A., Cloeckert, A., Garin, J., Gorvel, J. P., Moriyon, I., Moreno, E. & Lopez-Goni, I. (2002). "The two-component system BvrR/BvrS essential for *Brucella abortus* virulence regulates the expression of outer membrane proteins with counterparts in members of the Rhizobiaceae." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(19): 12375-80.
- Hawn, T. R., Verbon, A. Lettinga, K. D. Zhao, L. P., Li, S. S., Laws, R. J., Skerret, S. J., Beutler, B. Schroeder, L., Nachman, A., Ozinsky, A., Smith, K. D. & Aderem, A. (2003). "A common dominant TLR5 stop codon polymorphism abolishes flagellin signaling and is associated with susceptibility to legionnaires' disease." J Exp Med. **198**(10): 1563-72.
- Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M. & Aderem, A. (2001). "The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5." Nature **410**(6832): 1099-103.
- Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A. & Ezekowitz, R. A. (1999). "Phylogenetic perspectives in innate immunity." Science **284**(5418): 1313-8.
- Janeway, C. A. Jr. & Medzhitov, R. (2002). "Innate immune recognition." Annu Rev Immunol **20**: 197-216.
- Jimenez de Bagues, M. P., Dudal, S., Dornand, J. & Gross, A. (2005). "Cellular bioterrorism: how *Brucella* corrupts macrophage physiology to promote invasion and proliferation." Clin Immunol **114**(3): 227-38.
- Jubier-Maurin, V., Boigegrain, R. A., Cloeckert, A., Gross, A., Alvarez-Martinez, M. T., Terraza, A., Liautard, J., Kohler, S., Rouot, B., Dornand, J. & Liautard, J. P. (2001). "Major outer membrane protein Omp25 of *Brucella suis* is involved in inhibition of tumor necrosis factor alpha production during infection of human macrophages." Infect Immun **69**(8): 4823-30.
- Kavermann, H., Burns, B. P., Angermuller, K., Odenbreit, S., Fischer, W., Melchers, K. & Haas, R. (2003). "Identification and characterization of *Helicobacter pylori* genes essential for gastric colonization." J Exp Med **197**(7): 813-22.

- Kawai, T. & Akira, S. (2009). "The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition." Int Immunol **21**(4): 317-37.
- Kim, S., Watarai, M., Suzuki, H., Makino, S., Kodama, T. & Shirahata, T. (2004). "Lipid raft microdomains mediate class A scavenger receptor-dependent infection of *Brucella abortus*." Microb Pathog **37**(1): 9-11.
- Kohler, S., Michaux-Charachon, S., Porte, F., Ramuz, M. & Liautard, J. P. (2003). "What is the nature of the replicative niche of a stealthy bug named *Brucella*?" Trends Microbiol **11**(5): 215-9.
- Kohler, S., Foulongne, V., Ouahrani-Bettache, S., Bourg, G., Teyssier, J., Ramuz, M. & Liautard, J. P. (2002). "The analysis of the intramacrophagic virulome of *Brucella suis* deciphers the environment encountered by the pathogen inside the macrophage host cell." Proc Natl Acad Sci USA **99**(24): 15711-6.
- Kono, H. & Rock, K. L. (2008). "How dying cells alert the immune system to danger." Nat Rev Immunol **8**(4): 279-89.
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M., 2nd & Peterson, K. M. (1995). "Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes." Gene **166**(1): 175-6.
- Kumar, H., Kawai, T. & Akira, S. (2009). "Toll-like receptors and innate immunity." Biochem Biophys Res Commun **388**(4): 621-5.
- Lamkanfi, Amer, M., A., Kanneganti, T. D., Munoz-Planillo, R., Chen, G., Vandenabeele, P., Fortier, A., Gros, P. & Nunez, G. (2007). "The Nod-like receptor family member Naip5/Birc1e restricts *Legionella pneumophila* growth independently of caspase-1 activation." J Immunol **178**(12): 8022-7.
- Lamkanfi, M. & Dixit, V. M. (2009). "Inflammasomes: guardians of cytosolic sanctity." Immunol Rev **227**(1): 95-105.
- Lapaque, N., Moriyon, I., Moreno, E. & Gorvel, J. P. (2005). "*Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor." Curr Opin Microbiol **8**(1): 60-6.

- Lapaque, N., Muller, A., Alexopoulou, L., Howard, J. C. & Gorvel, J. P. (2009). "Brucella abortus induces Irgm3 and Irga6 expression via type-I IFN by a MyD88-dependent pathway, without the requirement of TLR2, TLR4, TLR5 and TLR9." Microb Pathog **47**(6): 299-304.
- Lara-Tejero, M., Sutterwala, F. S., Ogura, Y., Grant, E. P., Bertin, J., Coyle, A. J., Flavell, R. A. & Galan, J. E. (2006). "Role of the caspase-1 inflammasome in Salmonella typhimurium pathogenesis." J Exp Med **203**(6): 1407-12.
- Leonard, S., Ferrooz, J., Haine, V., Danese, I., Fretin, D., Tibor, A., de Walque, S., De Bolle, X. & Letesson, J. J. (2007). "FtcR is a new master regulator of the flagellar system of Brucella melitensis 16M with homologs in Rhizobiaceae." J Bacteriol **189**(1): 131-41.
- Lestrade, P., Dricot, A., Delrue, R. M., Lambert, C., Martinelli, V., De Bolle, X., Letesson, J. J. & Tibor, A. (2003). "Attenuated signature-tagged mutagenesis mutants of Brucella melitensis identified during the acute phase of infection in mice." Infect Immun **71**(12): 7053-60.
- Liautard, J., Ouahrani-Bettache, S., Jubier-Maurin, V., Lafont, V., Kohler, S. & Liautard, J. P. (2007). "Identification and isolation of Brucella suis virulence genes involved in resistance to the human innate immune system." Infect Immun **75**(11): 5167-74.
- Lightfield, K. L., Persson, J., Brubaker, S. W., Witte, C. E., von Moltke, J., Dunipace, E. A., Henry, T., Sun, Y. H., Cado, D., Dietrich, W. F., Monack, D. M., Tsolis, R. M. & Vance, R. E. (2008). "Critical function for Naip5 in inflammasome activation by a conserved carboxy-terminal domain of flagellin." Nat Immunol **9**(10): 1171-8.
- Llewellyn, M., Dutton, R. J., Easter, J., O'Donnol, D. & Gober, J.W. (2005). "The conserved flaF gene has a critical role in coupling flagellin translation and assembly in Caulobacter crescentus." Mol Microbiol **57**(4): 1127-42.
- Lopez-Goni, I., Guzman-Verri, C., Manterola, L., Sola-Landa, A., Moriyon, I. & Moreno, E (2002). "Regulation of Brucella virulence by the two-component system BvrR/BvrS." Vet Microbiol **90**(1-4): 329-39.

- Mangan, E. K., Malakooti, J., Caballero, A., Anderson, P., Ely, B. & Gober, J.W. (1999). "FliB couples flagellum assembly to gene expression in *Caulobacter crescentus*." J Bacteriol **181**(19): 6160-70.
- Manterola, L., Moriyon, I., Moreno, E., Sola-Landa, A., Weiss, D. S., Koch, M. H., Howe, J., Brandenburg, K. & Lopez-Goni, I. (2005). "The lipopolysaccharide of *Brucella abortus* BvrS/BvrR mutants contains lipid A modifications and has higher affinity for bactericidal cationic peptides." J Bacteriol **187**(16): 5631-9.
- Martinon, F., Mayor, A. & Tschopp, J. (2009). "The inflammasomes: guardians of the body." Annu Rev Immunol **27**: 229-65.
- Matzinger, P. (1994). "Tolerance, danger, and the extended family." Annu Rev Immunol **12**: 991-1045.
- Means, T. K., Hayashi, F., Smith, K.D., Aderem, A. & Luster, A.D. (2003). "The Toll-like receptor 5 stimulus bacterial flagellin induces maturation and chemokine production in human dendritic cells." J Immunol **170**(10): 5165-75.
- Medzhitov, R. (2007). "Recognition of microorganisms and activation of the immune response." Nature **449**(7164): 819-26.
- Metcalfe, H. J., Best, A., Kanellos, T., La Ragione, R.M. & Werling, D. (2010) "Flagellin expression enhances *Salmonella* accumulation in TLR5-positive macrophages." Dev Comp Immunol **34**(8): 797-804.
- Miao, E. A., Andersen-Nissen, E., Warren, S. E. & Aderem, A. (2007). "TLR5 and Ipaf: dual sensors of bacterial flagellin in the innate immune system." Semin Immunopathol **29**(3): 275-88.
- Miao, E. A., Mao, D. P., Yudkovsky, N., Bonneau, R., Lorang, C. G., Warren, S. E., Leaf, I. A. & Aderem, A. (2010). "Innate immune detection of the type III secretion apparatus through the NLRC4 inflammasome." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(7): 3076-80.
- Miller, V. L. & Mekalanos, J. J. (1988). "A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires toxR." J Bacteriol **170**(6): 2575-83.

- Minamino, T., Imada, K., & Namba, K. (2008). "Mechanisms of type III protein export for bacterial flagellar assembly." Mol Biosyst **4**(11): 1105-15.
- Moreno, E. & Moriyon, I. (2002). "Brucella melitensis: a nasty bug with hidden credentials for virulence." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(1): 1-3.
- Mosser, D. M. (2003). "The many faces of macrophage activation." J Leukoc Biol **73**(2): 209-12.
- Naroeni, A. & Porte, F. (2002). "Role of cholesterol and the ganglioside GM(1) in entry and short-term survival of Brucella suis in murine macrophages." Infect Immun **70**(3): 1640-4.
- O'Callaghan, D., Cazevieuille, C., Allardet-Servent, A., Boschioli, M. L., Bourg, G., Foulongne, V., Frutos, P., Kulakov, Y. & Ramuz, M. (1999). "A homologue of the Agrobacterium tumefaciens VirB and Bordetella pertussis Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of Brucella suis." Mol Microbiol **33**(6): 1210-20.
- Oliveira, S. C., de Oliveira, F. S., Macedo, G. C., de Almeida, L. A. & Carvalho, N. B. (2008). "The role of innate immune receptors in the control of Brucella abortus infection: toll-like receptors and beyond." Microbes Infect **10**(9): 1005-9.
- Palm, N. W. & Medzhitov, R. (2009). "Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity." Immunol Rev **227**(1): 221-33.
- Pappas, G., Akritidis, N., Bosilkovski, M. & Tsianos, E. (2005). "Brucellosis." N Engl J Med **352**(22): 2325-36.
- Pappas, G., Panagopoulou, P., Christou, L. & Akritidis, N. (2006). "Brucella as a biological weapon." Cell Mol Life Sci **63**(19-20): 2229-36.
- Parent, M. A., Goenka, R., Murphy, E., Levier, K., Carreiro, N., Golding, B., Ferguson, G., Roop, R. M., 2nd, Walker, G. C. & Baldwin, C. L. (2007). "Brucella abortus bacA mutant induces greater pro-inflammatory cytokines than the wild-type parent strain." Microbes Infect **9**(1): 55-62.

- Parker, L. C., Prince, L. R. & Sabroe, I. (2007). "Translational mini-review series on Toll-like receptors: networks regulated by Toll-like receptors mediate innate and adaptive immunity." Clin Exp Immunol **147**(2): 199-207.
- Pei, J., Wu, Q., Kahl-McDonagh, M. & Ficht, T. A. (2008). "Cytotoxicity in macrophages infected with rough Brucella mutants is type IV secretion system dependent." Infect Immun **76**(1): 30-7.
- Porte, F., Naroeni, A., Ouahrani-Bettache, S. & Liautard, J. P. (2003). "Role of the Brucella suis lipopolysaccharide O antigen in phagosomal genesis and in inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages." Infect Immun **71**(3): 1481-90.
- Poyet, J. L., Srinivasula, S. M., Tnani, M., Razmara, M., Fernandes-Alnemri, T. & Alnemri, E. S. (2001). "Identification of Ipaf, a human caspase-1-activating protein related to Apaf-1." J Biol Chem **276**(30): 28309-13.
- Radhakrishnan, G. K., Yu, Q., Harms, J. S. & Splitter, G. A. (2009). "Brucella TIR Domain-containing Protein Mimics Properties of the Toll-like Receptor Adaptor Protein TIRAP." J Biol Chem **284**(15): 9892-8.
- Ramos, H. C., Rumbo, M., & Sirard, J. C. (2004). "Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa." Trends Microbiol **12**(11): 509-17.
- Ren, T., D. S. Zamboni, Roy, C. R., Dietrich, W. F. & Vance, R. E. (2006). "Flagellin-deficient Legionella mutants evade caspase-1- and Naip5-mediated macrophage immunity." PLoS Pathog **2**(3): e18.
- Rhee, S. H., Keates, A. C., Moyer, M.P. & Pouthoulakis, C. (2004). "MEK is a key modulator for TLR5-induced interleukin-8 and MIP3alpha gene expression in non-transformed human colonic epithelial cells." J Biol Chem **279**(24): 25179-88.
- Roop, R. M., 2nd, Bellaire, B. H., Valderas, M. W. & Cardelli, J. A. (2004). "Adaptation of the Brucellae to their intracellular niche." Mol Microbiol **52**(3): 621-30.
- Roy, C. R. & Zamboni, D. S. (2006). "Cytosolic detection of flagellin: a deadly twist." Nat Immunol **7**(6): 549-51.

- Salcedo, S. P., Marchesini, M. I., Lelouard, H., Fugier, E., Jolly, G., Balor, S., Muller, A., Lapaque, N., Demaria, O., Alexopoulou, L., Comerchi, D. J., Ugalde, R. A., Pierre, P. & Gorvel, J. P. (2008). "Brucella control of dendritic cell maturation is dependent on the TIR-containing protein Btp1." PLoS Pathog **4**(2): e21.
- Schmitz, J., A. Owyang, Oldham, E., Song, Y., Murphy, E., McClanahan, T. K., Zurawski, G., Moshrefi, M., Qin, J., Li, X., Gorman, D. M., Bazan, J. K. & Kastelein, R. A. (2005). "IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines." Immunity **23**(5): 479-90.
- Scholz, H. C., Hubalek, Z., Sedlacek, I., Vergnaud, G., Tomaso, H., Al Dahouk, S., Melzer, F., Kampfer, P., Neubauer, H., Cloeckert, A., Maquart, M., Zygmunt, M. S., Whatmore, A. M., Falsen, E., Bahn, P., Gollner, C., Pfeffer, M., Huber, B., Busse, H. J. & Nockler, K. (2008). "Brucella microti sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*." Int J Syst Evol Microbiol **58**(Pt 2): 375-82.
- Seleem, M. N., Boyle, S. M. & Sriranganathan, N. (2008). "Brucella: a pathogen without classic virulence genes." Vet Microbiol **129**(1-2): 1-14.
- Shao, W., Yeretssian, G., Doiron, K., Hussian, S. N. & Saleh, M. (2007). "The caspase-1 digestome identifies the glycolysis pathway as a target during infection and septic shock." J Biol Chem **282**(50): 36321-9.
- Sierro, F., Dubois, B., Coste, A., Kaiserlian, D., Kraehenbuhl, J.P. & Sirard, J.C. (2001). "Flagellin stimulation of intestinal epithelial cells triggers CCL20-mediated migration of dendritic cells." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(24): 13722-7.
- Smith, K. D., Andersen-Nissen, E., Hayashi, F., Strobe, K., Bergman, M. A., Barrett, S. L., Cookson, B. T. & Aderem, A. (2003). "Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility." Nat Immunol **4**(12): 1247-53.
- Sola-Landa, A., Pizarro-Cerda, J., Grillo, M. J., Moreno, E., Moriyon, I., Blasco, J. M., Gorvel, J. P. & Lopez-Goni, I. (1998). "A two-component regulatory system playing a critical role in plant

- pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence." Mol Microbiol **29**(1): 125-38.
- Starr, T., Ng, T. W., Wehrly, T. D., Knodler, L. A. & Celli, J. (2008). "Brucella intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment." Traffic **9**(5): 678-94.
- Subramanian, N. & Qadri, A. (2006). "Lysophospholipid sensing triggers secretion of flagellin from pathogenic salmonella." Nat Immunol **7**(6): 583-9.
- Sun, Y. H., Rolan, H. G. & Tsolis, R. M. (2007). "Injection of flagellin into the host cell cytosol by *Salmonella enterica* serotype Typhimurium." J Biol Chem **282**(47): 33897-901.
- Sutterwala, F. S., Mijares, L. A., Li, L., Ogura, Y., Kazmierczak, B. I. & Flavell, R. A. (2007). "Immune recognition of *Pseudomonas aeruginosa* mediated by the IPAF/NLRC4 inflammasome." J Exp Med **204**(13): 3235-45.
- Sutterwala, F. S., Ogura, Y. & Flavell, R. A. (2007). "The inflammasome in pathogen recognition and inflammation." J Leukoc Biol **82**(2): 259-64.
- Suzuki, T., Franchi, L., Toma, C., Ashida, H., Ogawa, M., Yoshikawa, Y., Mimuro, H., Inohara, N., Sasakawa, C. & Nunez, G. (2007). "Differential regulation of caspase-1 activation, pyroptosis, and autophagy via Ipaf and ASC in *Shigella*-infected macrophages." PLoS Pathog **3**(8): e111.
- Takeda, K. & Akira, S. (2003). "Toll receptors and pathogen resistance." Cell Microbiol **5**(3): 143-53.
- Uematsu, S. & Akira, S. (2006a). "The role of Toll-like receptors in immune disorders." Expert Opin Biol Ther **6**(3): 203-14.
- Uematsu, S. & Akira, S. (2006b). "Toll-like receptors and innate immunity." J Mol Med **84**(9): 712-25.
- Uematsu, S., Jang, M. H., Chevrier, N., Guo, Z., Kumagai, Y., Yamamoto, M., Kato, H., Sougawa, N., Matsui, H., Kuwata, H., Hemmi, H., Coban, C., Kawai, T., Ishii, K. J., Takeuchi, O., Miyasaka, M., Takeda, K. & Akira, S. (2006). "Detection of pathogenic intestinal bacteria by Toll-like receptor 5 on intestinal CD11c+ lamina propria cells." Nat Immunol **7**(8): 868-74.

- Vance, R. E., Isberg, R. R. & Portnoy, D. A. (2009). "Patterns of pathogenesis: discrimination of pathogenic and nonpathogenic microbes by the innate immune system." Cell Host Microbe **6**(1): 10-21.
- Watarai, M., Kim, S., Erdenebaatar, J., Makino, S., Horiuchi, M., Shirahata, T., Sakaguchi, S. & Katamine, S. (2003). "Cellular prion protein promotes Brucella infection into macrophages." J Exp Med **198**(1): 5-17.
- Wright, E. K., Goodart, S. A., Gowney, J. D., Hadinoto, V., Endrizzi, M. G., Long, E. M., Sadigh, K., Abney, A. L., Bernstein-Hanley, I. & Dietrich, W. F. (2003). "Naip5 affects host susceptibility to the intracellular pathogen Legionella pneumophila." Curr Biol **13**(1): 27-36.
- Yonekura, K., Maki-Yonekura, S. & Namba, K. (2003). "Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy." Nature **424**(6949): 643-50.
- Young, G. M., Schmiel, D. H. & Miller, V. L. (1999). "A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(11): 6456-61.
- Yu, H. B. & Finlay, B. B. (2008). "The caspase-1 inflammasome: a pilot of innate immune responses." Cell Host Microbe **4**(3): 198-208.
- Zamboni, D. S., Kobayashi, K. S., Kohlsdorf, T., Ogura, Y., Long, E. M., Vance, R. E., Kuida, K., Mariathasan, S., Dixit, V. M., Flavell, R. A., Dietrich, W. F. & Roy, C. R. (2006). "The Birc1e cytosolic pattern-recognition receptor contributes to the detection and control of Legionella pneumophila infection." Nat Immunol **7**(3): 318-25.
- Zhong, Z., Wang, Y., Qiao, F., Wang, Z., Du, X., Xu, J., Zhao, J., Qu, Q., Dong, S., Sun, Y., Huang, L., Huang, K. & Chen, Z. (2009). "Cytotoxicity of Brucella smooth strains for macrophages is mediated by increased secretion of the type IV secretion system." Microbiology **155**(Pt 10): 3392-402.

Zygmunt, M. S., Hagius, S. D., Walker, J. V. & Elzer, P. H. (2006). "Identification of *Brucella melitensis* 16M genes required for bacterial survival in the caprine host." Microbes Infect **8**(14-15): 2849-54.